

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
ZOOLOOGIA ÕPPETOOL

Alvar Räägel
KALADE TOKSIKOLOOGILISTE BIOMARKERITE
VÕRDLUS EESTI RANNIKUMERES

Magistritöö

Juhendajad: PhD Randel Kreitsberg
PhD Arvo Tuvikene

Tartu 2014

SISUKORD

1. SISSEJUHATUS	4
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
2.1 Läänemere ökotoksikoloogiline seisund	6
2.2. Biomarkerid kalades	8
2.3 Biotransformatsioon	11
2.4 Polütsükliised aromaatsed süsivesinikud ehk PAH-id	13
2.4.1 Fikseeritud lainepikkuse fluorestsentsanalüüs.....	15
2.4.2. EROD (<i>Ethoksüresurfiin-O-deetülaas</i>) test.....	15
2.5. Eksperimentaalses osas uuritud kalaliikide lühikirjeldused	16
3. MATERJAL JA METOODIKA	19
3.1. Uurimisalade kirjeldus.....	19
3.2. Uuritavad liigid.....	20
3.3. Kalade analüüs.....	21
3.4. EROD aktiivsuse mõõtmine	21
3.5. PAH-i spetsiifiline fluorestsentsi mõõtmine	22
3.6. Andmetöötlus	23
4. TULEMUSED	24
4.1 PAH metaboliitide fluorestsentsi mõõtmine	24
4.2. EROD test.....	28
4.3. Maksa indeks	30
4.4. Konditsioonifaktor (CF)	32
5. ARUTELU	34
6. KOKKUVÕTE	41
7. SUMMARY	42
8. TÄNUAVALDUSED.....	43
9. KASUTATUD KIRJANDUS.....	44
10. LISA 1.....	51

1. SISSEJUHATUS

Maailmas on vähe paiku, mis poleks mõjutatud antropogeensetest mürkainetest. Toksikandid on kuhjunud loomade kudedesse ka kõige inimkaugemates paikades, näiteks poolustel. Ohtlike kemikaalide kontsentratsioonid on tiheda asustusega ümbritsetud Läänemerel aga veelgi probleemsemad.

Aastatel 1999-2007 viidi läbi uuringud 144-s uurimisjaamas Läänemerel ning selgus, et neist 137 olid mõjutatud tokiliste ainete poolt (HELCOM 2010). Enimtuntud saasteaineteks on raskemetallid, polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud, polüklooritud bifenüülid, pestitsiidid ning ravimite jäägid. Lisaks kõrgele saasteainete kontsentratsioonile on osad uuringud näidanud Läänemere järkjärgulist genotokilisuse kasvu kaladele (Baršiene jt. 2012). Kõik see info viitab mere keemilise reostuse monitooringu hädavajalikkusele ning kemikaalide mõju uurimisele elusorganismides. Kuna veekeskkond sisaldab segu erinevatest kemikaalidest (mitmete olemasolu meres veel teadmata), on keeruline või lausa võimatu avastada ja uurida neist igatühte. Seetõttu on põhjendatud uurida multistressorite mõju elusorganismidele.

Varasemalt on reostusainete avastamiseks kasutatud vaid keemiliste ainete kontsentratsioonide kindlakstegemist, kuid viimastel aastakümnetel on teadlaste poolt paraleelselt kasutusele võetud ka biomarkerite analüüsimine. (Whyte ja Tillitt 2000). Biomarkerina võib käsitleda kõiki toksiliste ainete poolt esile kutsutud muutusi organismis. Seeläbi on biomarkerid kasulikud indikaatorid toksikandi levikule ja ka organismi reaktsioonile antud teguri suhtes (Peakall 1994; van der Oost jt. 2003). Head biomarkerid annavad saasteainetega kokkupuutele kiire ja varajase vastuse, võimaldades omakorda kasutusele võtta parandavaid ning ennetavaid meetmeid reostuse vähendamiseks (Livingstone 1993). Näitena peamistest biomarkeritest võib nimetada PAH metaboliitide kontsentratsiooni sapis, 7-etoksüresorfiin –O- deetülaasi (EROD) aktiivsust, lüsoosoomide membraani aktiivsust, erütrotsüütide lõhestatust, maksa, gonaadi ja kehakonditsiooni indeksit ning muutusi populatsiooni struktuuris. Biomarkerite vastuseid kalade rakkude ja kudedes on ökotoksikoloogide poolt laialdaselt kasutatud Läänemere ümbruse maades, saades nõnda kasulikku infot kalade tervise, keskkonna stressorite ja inimsurve mõjust kalade elukeskkonnas. Kõige sagedasemini on sellistes töodes kasutatud

lesta (*Platichthys flesus*), räime (*Clupea harengus membras*), ahvenat (*Perca fluviatilis* L.) ja emakala (*Zoarces viviparus*). (Broeg ja Lehtonen, 2006; Gercken jt. 2006; Schiedek jt., 2006). Emakala kasutatakse samuti potentsiaalselt ohtlike ainete bioindikaatorina Saksamaa Liigipangas, Läänemere kaitse komisjonis (Helsinki Commission – HELCOM) ja BONUS Joint Baltic Sea uurimusprogrammis.

Vaatamata biomarkerite laialdasele kasutamisele on mitmete biomarkerite usaldatavuse suhtes kerkinud üles kahtlusi. Näiteks on leitud, et EROD aktiivsus on tugevasti mõjutatud kala soost, aastaajast, reproduktiivsest faasist, kehamõõtmetest ja vanusest (Tairova jt. 2012; Hedman jt. 2011). Kõrge maksa somaatiline indeks (LSI) võib demonstreerida reostatust, aga samuti ka head toitainete baasi (van der Oost jt. 2003). Seega usaldusväärsed biomarkerid kiireks keskkonnatervise analüüsiks endiselt puuduvad.

Hetkel seiratakse Eesti rannikumere keemilist reostatust kahe kalaliigi abil, kelleks on räim ja ahven. Raskemetallide kontsentratsioon kalade maksas määratakse aatomabsorptsioonspektrofotomeetrilisel meetodil, kloororgaanilised ühendid analüüsitakse kala lihase proovist gaasikromatograafia abil. Biomarkerite analüüsimine on keskmiselt märksa soodsam kui keemiliste analüüsides tegemine ning teoreetiliselt võiks anda infot pikaajalisema reostuse ja kalade tervisliku seisundi ja kemikaalide kumulatiivse mõju kohta.

Varem on Eestis rannikumeres üksikuid biomarkerite uuringuid viidud läbi lesta, emakala ja räime peal. Oma uurimustöös kasutan viite levinud kalaliiki- lesta, emakala, räime, särge, ning ahvenat.

Minu töö eesmärk on mõõta levinumaid ja kergesti analüüsitavamaid toksikoloogilisi biomarkereid rannikumere kaladel, et testida nende sobivust informatiivse ja kuluefektiivse merereostuse seire vahendina Eesti oludes. Samuti soovin leida vastust, kas erinevate liikidel mõõdetud biomarkerite varieeruvusele on suurem mõju kala liigil või püügikoha reostatusel. Uurin ka erinevate biomarkerite tulemuste omavahelist korreleeruvust. Võrdlemiseks kasutan 4 erinevat biomarkerit- PAH-i metaboliitide kontsentratsioon sapis, EROD-i aktiivsus, maksaindeksi (LSI) ning keha konditsiooni faktorit (CF).

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

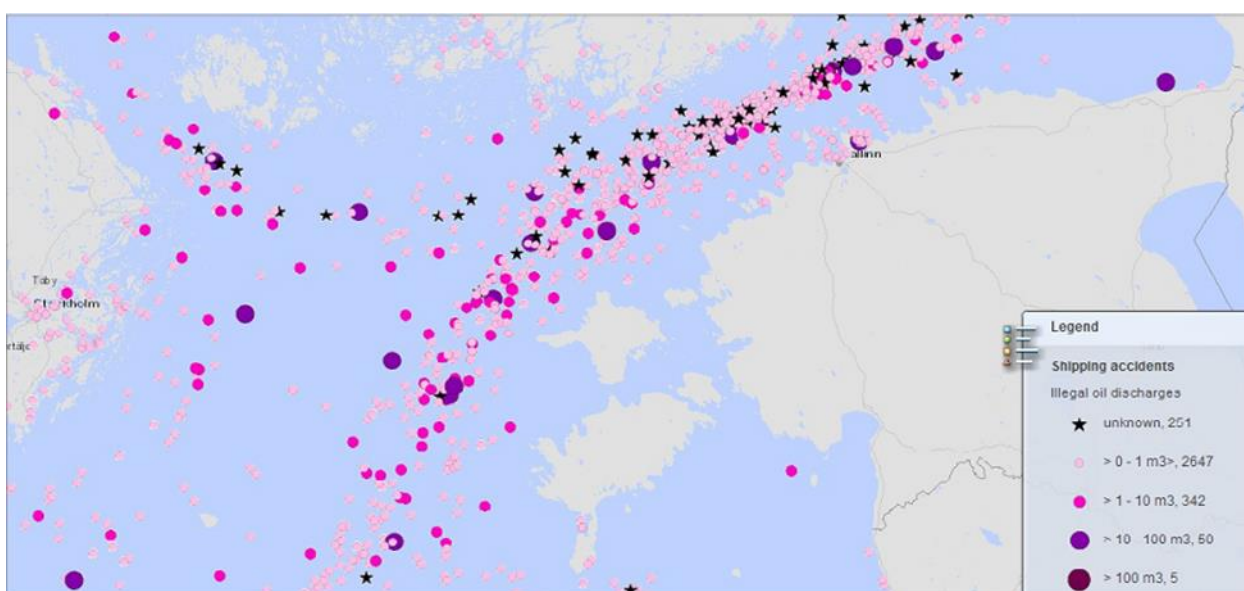
2.1 Läänemere ökotoksikoloogiline seisund

Läänemere äärsetes riikides sai tööstuslik revolutsioon alguse üle saja aasta tagasi ning alates sellest on olnud see meri intensiivselt mõjutatud erinevate inimtekkeliste saasteallikate poolt. Jääkained, mida toodavad 85 miljonit elanikku igapäevaselt Läänemere suurel valgalal, jäävad pikalt mõjutama merekeskkonda, sest isegi 30 aastase veevahetusperioodi lõppedes on osad jääkained talletunud setetesse. Seega võib pidada Läänemerd üheks saastunumaks mereks maailmas (Marmon jt. 2009; Baršiene jt. 2012). Riimvees on väike liigiline mitmekesisus ning seetõttu on ökosüsteem ohtlikele ainetele haavatavam, sest üksikute liikide kadumine võib põhjustada terve süsteemi tasakaalu häireid. Keemiline saastatus meres kujutab otsest toksilist ohtu veeorganismidele, põhjustab nende elupaikade hävinemist ning põhjustab mürkide biomagnifikatsiooni toiduahelas akumulioneerudes tippkiskjates, sealhulgas inimestes.

Auto- ja laevaliiklusest, tööstusest, intensiivsest põllumajandusest ja karjakasvatusest satub Läänemere õhu, vooluvete ja vahetu kokkupuute abil palju erinevaid toksilisi aineid. Peamised Läänemerd mõjutavad saasteained on dioksiinid ja dioksiinilaadsed ühendid, polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH-id), polüklooritud bifenüülid, raskmetallid, kloororgaanilised insektitsiidid, mõned herbitsiidid, radioaktiivsed ained, broomi sisaldavad leegiaeglustid, tributüültina jne. Neil kemikaalidel on erinevad algallikad. Mõned saasteained pärinevad peamiselt põllumajandusest (pestitsiidid), teised levivad ennekõike läbi atmosfäärse depositsiooni (dioksiinid) ning levivad pikkade vahemaade taha- hinnanguliselt 60% kaadmiumist, 84% pliiist ja 79% elavhõbedast on pärit Tšehhist, Suurbritanniast, Belgiast ja Prantsusmaalt (HELCOM 2010). Ravimijäägid tulevad peamiselt läbi tsentraalkanaliseerimise, sest veepuhastid pole võimelised neid kinni püüdma. Läänemere seisundit mõjutab oluliselt jõgedega sissekantav reostus tööstus- ning põllumajandusüksustest ja kodustest majapidamistest.

Üks suurimaid reostuse allikaid Läänemeres on tihe laevaliiklus. HELCOM-i 2011. aasta andmetel võib igal ajahetkel viibida Läänemerele ligi 2000 laeva. 2008. aastal moodustasid

tankerid 20% kõikidest alustest, mis sisenesid läbi Kategati väina Läänemerre. Kokku transportisid need 170 miljonit tonni naftat (HELCOM, 2010b). Õlireostuste sagedus on viimase paarikümne aasta jooksul kõvasti vähenenud, 763 korralt 1989. aastal 210 korrani 2008. aastal (HELCOM, 2009b). Samuti on vähenenud reostuse kogumaht, hinnanguline õlireostuse maht 2008. aastal oli 64,3 kuupmeetrit (Joonis 1). Vaatamata vähenenud õlireostuse mahule, kasvab oht reostuste tekkeks, sest laevaliiklus Läänemerel suureneb. Lisaks õnnetustele jõuavad saasteained vette läbi põlemisproduktide emissiooni, mürkvärvide lekkimise ja tahtliku või tahtmatu reostuse tagajärjel.



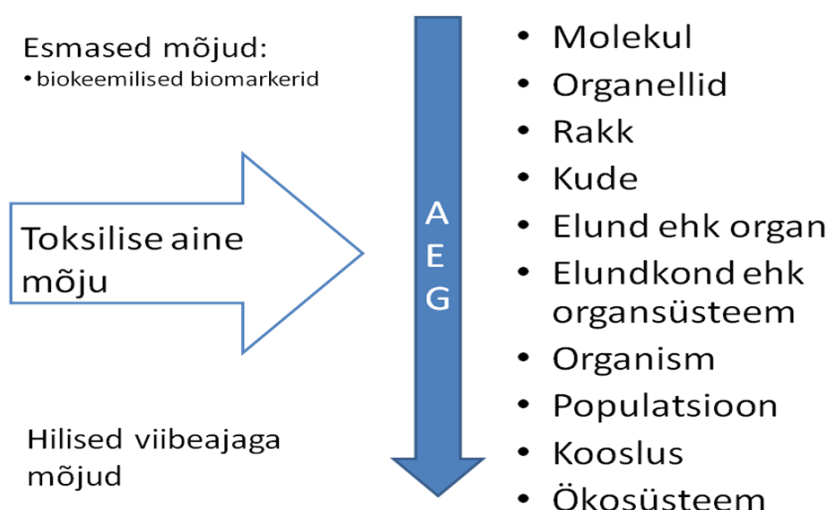
Joonis 1. Ebaseaduslikud naftaheitmed Läänemeres Eesti ranniku lähistel vaadelduna õhu järelvalve tegevuste käigus 1998–2012 (HELCOM, 2013).

Kuigi Lehtonen oma 2006. aasta uuringus leidis, et klassikaliste mürkemikaalide nagu PCB-de ja DDT-de kontsentratsioon, on Läänemeres võrreldes paarikümne aasta tagusega vähenenud, on veekeskkonnas esindatud keemiliste mürkemikaalide spektrum laiem kui kunagi varem. Vaatamata PCB-de ja DDT-de kontsentratsiooni vähenemisele on nende ja mitmete dioksiinide, raskemetallide, alküülfenoolide, polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike kogus Läänemere kalades, karpides ja siin pesitsevates lindudes kõrgeim kui kusagil mujal maailmas (HELCOM, 2010). Aastatel 1999-2007 on HELCOM-i toodud andemetel 144 Läänemere osast 137 mõjutatud toksiliste ainete poolt. Kõige reostunumateks osadeks peetakse Läänemere lõunaosa Kiele ja Mecklenburgi lahte (HELCOM, 2010). Aastatel 2009-

2011 lesta ja räime peal läbiviidud uuringud näitasid, et 80,8% uuritavatest lestadest ning 42,4% räimedest elas kõrge toksilisusega piirkonnas ning nende organismis esinesid rakulisel tasandil saastusest tingitud muutused (erütrotsüütide tuumade mutatsioon). Lisaks on alates 2000. aastast läbi viidud uuringud näidanud järkjärgulist keskkonna genotoksilisuse tõusu, mistõttu tekivad mutatsioonid organismide molekulaarsel ja rakulisel tasemel (Baršiene jt. 2012).

2.2. Biomarkerid kalades

Biomarkeriks loetakse kõik organismis toimuvad bioloogiliste protsesside muutused, mille on esile kutsunud eksponeeritus saasteainetele (Peakall, 1992). Organismi vastus toksilistele ainetele võib ulatuda molekulaarsest tasemest ökosüsteemini välja (joonis 2) ning jõuab kõrgematele hierarhilistele tasanditele saasteainete kontsentratsiooni suurenemisel või pikaajalisel eksponeeritusel.



Joonis 2. Keemiliste ainetega kokkupuute tagajärjel avalduvad muutused ajas erinevatel organismi tasemetel (Pruul 2012, <http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php>).

Seega saab kasutada esmaseid bioloogilistes protsessides toimuvaid muutusi varajasteks keskkonna saastuse indikaatoriteks (Peakall, 1992). Biomarker võib olla konkreetselt numbriliselt mõõdetav (muutus ensüümi aktiivsuses) või avalduda muutustena organismi käitumises (sigimiskäitumine). Vastusena keskkonnareostusele toimuvad organismis

molekulaarsel tasemel muutused ensüümide aktiivsuses, näiteks aktiveeritakse stressiproteiinid ja ensüümid mürkainete lagundamiseks (nt P450). Reostus võib mõjuda genotoksiliselt, mille puhul võivad tekkida struktuursed muutused DNA ahelas, valepaardumised, häired rakutsükli kontrollpunktides, defektsed DNA reparatsioonisüsteemid (Baršiene jt. 2012). Võivad esineda muutused organellide struktuurides, kromosomaalsed aberratsioonid ning tekkida mikrotuumadega rakud. Organite tasemel tekivad histopatoloogilised muutused- kasvajate teke, kahjustatud kude, väärarengud, kõrvalekalded organite suuruses, arengu aeglustumine. Reostuse tulemusel toimuvad muutused ka sigimises. Mitmed uuringud on näidanud, et keskkonnakemikaalide mõjul aeglustub gonaadide areng, mistõttu saavutavad kalad suguküpsuse normaalsest märksa hiljem (Spies jt. 1990, Tuvikene 1997). Lisaks mõjutavad keskkonnakemikaalid terve organismi immuunsüsteemi, reostusega aladel elavatel kaladel esineb märksa enam haigusi ning parasiite. Kõiki neid muutusi saab kasutada biomarkeritena kirjeldamaks kalade ja keskkonna üldist seisundit.

Head biomarkerid on sensitiivsed ka väikestele mürkainete kogusele keskkonnas ning annavad kiire bioloogilise vastuse, samuti on nad avastatavad varasel hierarhilisel tasemel (van der Oost jt. 2003). Selliste biomarkerite kasutamine keskkonnamonitooringul annab võimaluse vajadusel võtta kasutusele ennetavad meetmed enne kui reostuse mõju muutub ökosüsteemi seisukohalt pöördumatuks (Livingstone 1993). Keemiliste analüüside teostamine annab teada, kui suur on momendil konkreetse aine kontsentratsioon keskkonnas, kuid selle mõju organismile jääb teadmata, lisaks tuleb kindlalt teada, mis kemikaali keskkonnast otsida. Samuti on keemiliste analüüside tulemused tugevasti mõjutatud ilmastikuoludest ning perioodilistest muutustest kemikaali kättesaadavusel. Biomarkerite abil saab, aga anda hinnangu organismi ja keskkonna tervisele ilma, et oleks vaja teada reostuse põhjustanud kemikaale.

Peale keemilise reostuse mõjutab kalasid nende elukeskkonnas ka ridamisi teisi stressifaktoreid, nagu hüpoksia, kliimamuutus ja sellest tingitud muutused saakloomade dünaamikas. Biomarkereid uurides peaksime saama infot mitmete elukeskkonda koos mõjutavate tegurite koostoimest kaladele. Läbiviidavates keskkonnaseire uuringutes on soovitatav kasutada mitme eri liiki organismi biomarkereid, et paremini mõista kemikaalide

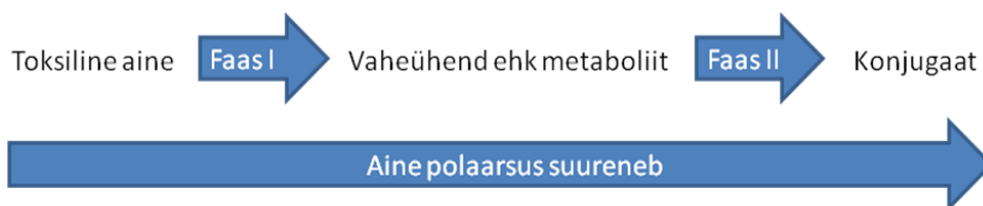
mõju tervele ökosüsteemile (Galloway jt. 2004). Ühtedeks sensitiivsemateks ja enim uuritud biomarkeriteks on ksenobiootikume detoksifitseerivad biotransformatsiooni läbi viivad ensüümid.

Vaatamata laialdasele biomarkerite kasutamisele keskkonnaseires, on neil omad puudused. On näidatud, et biomarkereid mõjutavad rida abiootilisi ja biootilisi tegureid. Nii näiteks on paljud biomarkerid sõltuvad kalade soost, vanusest, suurusest (van der Oost jt. 2003, Martinez-Alvarez jt. 2005). Lisaks võivad ensüümide aktiivsust muuta keskkonna temperatuur, soolsus jalahustunud hapniku hulk (van der Oost 2003, Rahman ja Thomas 2012, Kreitsberg jt. 2012). Tulemusi mõjutab ka teiste ainete hulk keskkonnas (raskemetallid).

Üks lihtsamaid biomarkereid on Fultoni konditsioonifaktor (CF), mille puhul arvutatakse kala kogumassi ning pikkuse suhe. Eeldatakse, et suurema CF faktoriga ehk raskemad kalad on elujõulisemad ja tervemad (Froese 2006). Biomarkeri puudujäägiks on vähene spetsiifilisus, faktor annab küll teada, et kala on stressitingimustes, kuid ei anna meile infot selle põhjustest. Teine sagedane biomarker on maksa massi indeks (LSI), mille puhul arvutatakse maksa massi suhe kogu keha massi. Indeksi väärtused on aga põhjustanud vastuolulisi arvamusi, ühelt poolt arvatakse, et maksaindeks suureneb vastusena tokiliste ainete leidumisele keskkonnas- maks üritab muutunud tingimustega toime tulla ja käivitub aktiivne maksarakkude jagunemine (Theodorakis jt. 1992, Everaarts jt. 1993), teisalt arvatakse, et reostuse puhul LSI indeks just väheneb, sest toimub kahjustada saanud maksarakkude sidekoestumine ning see viib maksa massi vähenemisele (Barton ja Schreck 1987, Tuvikene 1997, Kreitsberg jt. 2012).

2.3 Biotransformatsioon

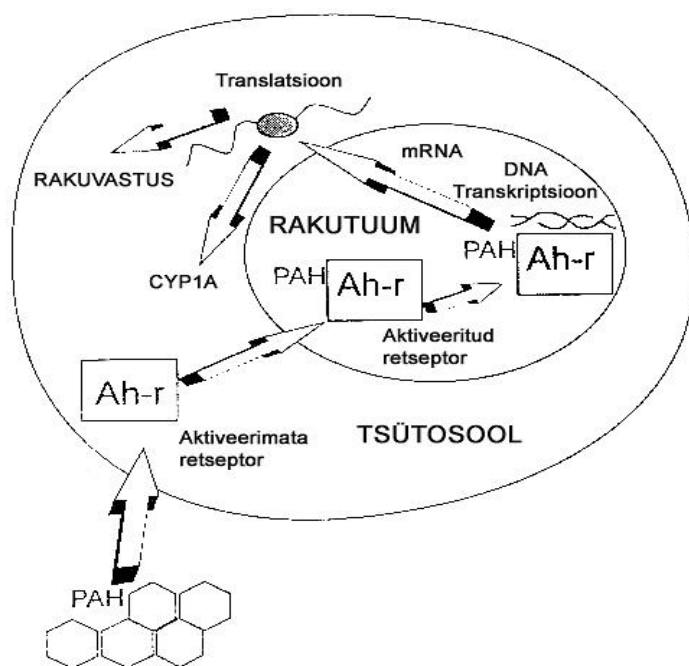
Keskkonnakemikaalid saab jagada polaarseteks ehk vees lahustuvateks ja mitte- polaarseteks ehk lipofiilseteks ühenditeks. Polaarsed ühendid väljutatakse kehast uriini kaudu ning need ei akumuleeru organismis. Valdavalt on rakku sisenevad toksilised ained aga lipofiilsed ning neerud ja maks ei ole võimelised neid kehast väljutama. Biotransformatsioon on protsess, mille käigus muudetakse lipofiilsed ksenobiootilised ained veeslahustuvateks ühenditeks (Varanasi 1989). Vähesel määral tekib selliseid lipofiilseid ühendeid ka loodulike metsatulekahjude ning vulkaanipursete käigus (näiteks PAH-id), kuid inimtegevuse tulemusena on nende kontsentratsioon keskkonnas mitmekordistunud. Biotransformatsiooni põhieesmärk on muuta lipofiilne aine kergemini kehast väljutatavaks, kuid selle käigus üldjuhul väheneb ka aine toksilisus, sest muutuste tõttu ei ole need võimelised enam oma retseptoritega seonduma (Toufexs 2010). Samas on aineid, mille bioloogiline aktiivsus biotransformatsiooni käigus suureneb ning tekkivad metaboliidid on oluliselt toksilisemad kui algühendid (nt PAH-id) (Vermeulen 1996). Biotransformatsioon toimub kaheetapiliselt (Joonis 3).



Joonis 3. Biotransformatsiooni põhiskeem (Pruul 2012, <http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php>).

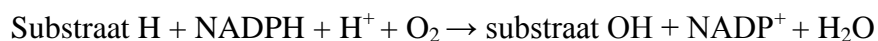
Esimese faasi reaktsioonide käigus toimub funktsionaalsete gruppide hüdroolüüs, oksüdatsioon või reduktsioon. Kõige olulisemad ensüümid biotransformatsiooni I faasis on tsütokroom P450 perekonda kuuluvad valgud (van der Oost jt. 2003), mis vastutavad põhilise oksüdatiivse metabolismi eest. P450 näol on tegemist laia perekonna heemi sisaldavate membraaniseoseliste ensüümidega, mis peamiselt lokaliseeruvad maksa endoplasmaatilises retiikulumis (Stegeman ja Hahn. 1994). Vähesel määral on ensüüm lokaliseerunud ka teistes

organites (Celander 1993). Kalades vastutab biotransformatsiooni eest üks konkreetne P450 perekonna ensüüm CYP1A (Andersson ja Forlin 1992). Rakku sisenemisel seostub lipofiilne aine aromaatsete süsivesinike retseptorile (Ah retseptor), mis käivitab signaaliülekanne raku tuuma. Raku tuumas seostub signaalmolekul P450 geenide regulatoorsele piirkonnale ning aktiveeritakse CYP1A geenide ekspressioon (Joonis 4) (Safe ja Krishnan 1995).



Joonis 4. CYP1A avaldumise kaskaad (Pruul 2012, <http://ipruul.planet.ee/toksikoloogia/doku.php>).

IBiotransformatsiooni I faasi toimumiseks läheb vaja hapnikku ja kahte vaba elektroni, viimased saadakse NADPH-lt tsütokroom P450 reduktaasi vahendusel. Toimub monooksügenaas, mille käigus liidetakse üks hapniku aatom algele substraadile, teine hapniku aatom redutseeritakse veeks (van der Oost jt. 2003).



Esimese faasi lõpuks on substraadile tekkinud hapnikulisamisega funktsionaalsed grupid (-OH, -COOH, -NH₂) (Toutoudaki 2010). Tekkinud dioole ja fenoolid kasutatakse substraadina biotransformatsiooni II faasi reaktsioonides. Esimese etapi produktid võivad läbida ka

teistkordse oksüdatsiooni, mille tulemusena moodustuvad ülimalt kantserogeensed diolepoksiidid ja fenooloksiidid, mis interakteeruvad DNA ning paljude valkudega. (Richardson jt. 2001, Kammann 2007).

II biotransformatsiooni faas kujutab endast järjestikuseid konjugatsioonireaktsioone, mille käigus liidetakse substraadile polaarseid keemilisi rühmi, kõige sagedasemini on nendeks sulfaadid, aminohapped, glükuroonhape (GA) või glutaatid (GSH) (Lech jt. 1985). Konjugatsiooni tulemusel on biotransformatsiooni lõpp- produktid vees lahustuvad ja kergesti kehast väljutatavad (Varanasi 1989).

On näidatud, et keskkonnareostuse suurenemisel, tõuseb organismis kiirelt CYP1A mRNA ning valkude tase (Stegeman ja Hahn 1994), kuid seda vaid juhul kui toksikandiks on Ah retseptorile seonduv aine. Sellisteks kemikaalideks on polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH), polüklooritud bifeniilid (PCB), polüklorineeritud dibensodioksiinid ja polüklorineeritud dibensofuraanid (PCDF) (van der Oost jt. 2003).

2.4 Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud ehk PAH-id

Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud ehk PAH-id on lipofiilsed mitut omavahel seotud benseenituumas sisaldavad orgaanilised ühendid (Tairova jt. 2012). PAH-id satuvad keskkonda nii looduslikult nafta merepõhjast immitsemisel, vulkaanipursetel kui antropogeense tegevuse tulemusel olles põhiliselt fossiilsete kütuste koostises. (Neff 2004). Inimtekkelist päritolu PAH-id satuvad veekeskkonda naftatorude lekkimisel, nafta töötlemisel, tööstuslike ja majapidamiste heitvetega ja heitgaasidega atmosfäärse depositsiooni kaudu (Varanasi 1989). Üldlevinud arusaamise kohaselt põhjustavad naftatoodetes leiduvatest ohtlikest ainetest vee-elustikule enim mürgitusi just PAH-id.

PAH-id on rasvlahustuvad ja seetõttu suudab organism need väljutada ainult biotransformatsiooni vahendusel, selle käigus aga tekivad niigi kantserogeensest substraadist veelgi ohtlikumad metaboliidid (Xue ja Warshawsky 2005). PAH-id põhjustavad turseid ja kasvajaid, väärarenguid, lõpuste kahjustusi, maksa arenguhälbeid, viljatust ning

immuunsüsteemi nõrgenemist (Tuvikene 1995, Vethaak ja Wester 1996). PAH metaboliidid seonduvad DNA ahelaga ning tekitavad lugemisraami muutusi ning valepaarumisi (Kammann 2007). Veekeskkonda sattunult absorbeeruvad nad orgaanilisse ja anorgaanilisse materjali ning ladestuvad põhjasetetes, seetõttu puutuvad PAH-idega kõige rohkem kokku põhjalise eluviisiga kalad (Varanasi 1989). Kalade organismi satuvad nad toiduga või difundeerudes veest läbi lõpuste rakumembraanide ning ladestuvad kudedes vaid väga vähesel määral, sest koheselt käivitub nende metabolism. Kõige kõrgem on PAH-ide kontsentratsioon põhjasetetes, seejärel veeorganismides ning kõige väiksem on nende tase veesambas. Hinnanguliselt on PAH-ide kontsentratsioon Läänemeres 2-10x kõrgem kui Põhjameres (Witt 1995).

Kuigi keskkonnas toimub PAH-ide biodegradatsioon nii anaeroobsetes kui aeroobsetes tingimustes, on see hüpoksia tingimustes väga aeglane protsess. Lisaks on anaeroobsetes tingimustes lagundamist näidatud ainult 2 ja 3 benseenituumaga PAH-ide puhul, rohkem kui 3 benseenituumaga ühendite lagundamist anaeroobsetes tingimustes täheldatud ei ole (Haritasu ja Kaushik 2009). Kalades suurendatakse hüpoksia tingimustes lõpustest läbivoolava vee hulka ning seetõttu difundeerub kala organismi suurem kogus PAH-e (Kreitsberg jt. 2013). Samuti on näidatud hüpoksia tingimustes CYP1A geeni ekspressiooni inhibeerimist (Rahman ja Thomas 2012).

Piisava hapniku olemasolul on PAH-ide metabolism efektiivne ning ei toimu aine akumulierumist organismis (Newman ja Unger 2003). Seega ei saa hinnata keskkonnas leiduvate PAH-ide hulka kalade lihaskoest võetud proovide abil. Peamiselt toimub PAH-ide metabolism maksas, millest sekreteeritakse tekkinud metaboliidid enne väljutamist sapipõide (van der Oost jt. 2003). Adekvaatseks biomarkeriks PAH-ide keskkonnas esinemise kohta loetakse PAH-ide metaboliitide kontsentratsiooni uurimist kalade sapist (Ariese jt. 2005).

2.4.1 Fikseeritud lainepikkuse fluorestsentsanalüüs

Fikseeritud lainepikkuse fluorestsentsanalüüs lahjendatud sapist on kõige kiirem ja tehniliselt vähemhõudlik meetod, mille abil saab uurida kalade PAH-idele eksponeeritust (Beyer jt. 2010). PAH metaboliidid on tugevad fluorofoorid, samal ajal kui ülejäänud sapis olevad ühendid fluorestseerumisvõimet ei oma. Erinevate PAH-ide ergastumis ja emissioonikiirgused on tugevas sõltuvuses nende struktuurist, üldjuhul väiksemad PAH metaboliitide molekulud (nt kahe tuumne naftaleen) ergastuvad väiksemal lainepikkusel kui suured, 5- ja 6- tuumsed, seetõttu saab seega saab fluorestsentsanalüüsi teel hinnata reostuse päritolu. 2- ja 3-tuumsed PAH-id pärinevad sageli toornafta ja laevakütuse reostusest (van der Oost jt. 2003). Liiklusest, kodustest majapidamistest ja tööstusest pärinevatele põlemisjääkidele vastab aga tugev signaal lainepikkusel, mis esindab 4 – ja 5/6 tuumseid PAH-e. Kuna sapis hulk ja seal leiduvate PAH-i metaboliitide kontsentratsioon sõltub lisaks reostusele ka ajast, millal kala viimati toitus, on soovitatud kinnipüütuid kalu hoida paar päeva ilma toitmata elus, enne sapi proovide korjamist (Vuorinen jt. 2006). Nälgimise ajal tõuseb kalas PAH-i metaboliitide kontsentratsioon sapis (Beyer jt. 1997). Kui kala asub sööma, siis sapp eritatakse seedesüsteemi ning sapipõis on tühi. Üsna peagi aga hakkab see uuesti täituma veega ja tekib esmane lahja sapivedelik. Üldiselt peetakse sapis leiduvate PAH-i metaboliitide leidmist fikseeritud lainepikkusega fluorestsentsi meetodil üsna usaldusväärseks biomarkeriks, mis korreleerub ka keemilise analüüsiga (Voureenen jt. 2006).

2.4.2. EROD (*Ethoksüresurfiin-O-deetülaas*) test

EROD test on enimkasutatav meetod hindamaks organismi eksponeeritust tasapinnalistele lipofiilsetele saasteainetele, millest enim uuritud on eksponeeritus PAH-idele (Hagger jt. 2006). Saasteainega kokkupuutel aktiveeritakse tsütokroom P450 CYP1A geenid ning algab biotransformatsioon. Mida saastatum on keskkond, seda kõrgem on CYP1A ensüümi katalüütiline aktiivsus (Tillit jt. 2000). EROD test põhineb kindla koguse sünteetilise PAH-i ethoksüresurfiin-O-deetülaasi lisamisel homogeniseeritud maksasegusse, misjärel indutseeritud CYP1A ensüüm katalüüsib substraadi resorufiiniks. Selle abil määratakse CYP1A ensüümiaktiivsuse tase.

EROD testi kasutavad paljud maailma riigid rannikumere reostuse seires, sealhulgas on see laialt kasutust leidnud ka Soomes (Pikkarainen 2006), Rootsis (Hanson jt. 2009, Hansson jt. 2006), Saksamaal (Wolz jt. 2009). Eestis on varasemalt keskkonnaseire uuringutel kasutanud EROD testi Kreitsberg ja Tuvikene (Kreitsberg 2012, 2013). EROD on väga tundlik meetod, sest reageerib kiirelt juba väikesele saasteaine kogusele keskkonnas (van der Oost jt. 2003).

Kui soov on uurida organismi eksponeeritus ainult PAH-idele esineb EROD-il, aga palju puudusi. EROD aktiivsus ei ole PAH-ide spetsiifiline, sest CYP1A ekspressiooni indutseerivad kõik substraadid, mis seonduvad Ah- retseptorile. Nagu eelnevalt mainitud, on sellisteks ühenditeks nii PAH-id, PCB-d kui dioksiinid. Seega on lisaks EROD testi teostamisele kasulik kombineerida tulemusi teiste analüüsidega (nt PAH metaboliitide tase sapis). Lisaks on leitud, et osad raskemetallid inhibeerivad CYP1A ensüümi aktiivsust ning nende olemasolul keskkonnas ei peegelda EROD test organismis tegelikult valitsevat olukorda (Viarengo jt. 1997). Samuti muutub CYP1A ensüümi regulatsioon hüpoksia tingimustes (Kreitsberg 2013; Rahman ja Thomas 2012). CYP1A ensüümi tase on mõjutatud ka organismi soost, näiteks on selle tase isastes kalades tunduvalt kõrgem (Whyte jt. 2000). Veelgi enam mõjutab ensüümi aktiivsust ümbritseva vee temperatuur, nii on suvised ja talvised ensüümi aktiivsused erinevad. Ka hiljem laboris EROD testi läbiviimisel tuleb tagada ühtlane toatemperatuur kõikide analüüside jooksul.

2.5. Eksperimentaalses osas uuritud kalaliikide lühikirjeldused

Lest (*Platichthys flesus*) on laialt levinud kõikjal Eesti rannikumeres ning eelistab elupaigana liivasemat- savisemat merepõhja. Läänemeres kõige rohkem esinev lest on süvikukudulest (*Platichthys flesus trachurus Dunker*), kuid lisaks neile esinevad populatsioonid, kes eelistavad elupaiga- ja kudemispaigana madala soolsusega lahtesid (Ojaveer, 2003). Antud populatsiooni isendeid on kasutatud ka selle magistritöö raames. Lestad on põhjalise eluviisiga ning puutuvad pidevalt kokku setetesse kuhjunud saasteainetega. Seetõttu kasutatakse lesta paljude riikide keskkonnareostuse monitooringutel.

Emakala (*Zoarces viviparus*) on arvukas liik Riia kui ka Soome lahes. Emakala valib oma elupaigaks rikkaliku taimestikuga alasid, mis paiknevad kivisel ja liivasel pinnasel. Levikumustrit mõjutavad nii abiootilised tegurid nagu, temperatuur, soolsus, saasteainete kontsentratsioon; kui ka biootilised tingimused nagu toiduobjektide levik. Emakalad on pikaelised, keskmine isendi vanus küündib 9 aastani (Mikelsaar 1984). Mitmed emakala bioloogia uuringud näitavad liigi paikset eluviisi ja vähest migreerumist (Jacobsson jt.1993, Ojaveer ja Lankov 1997, Ojaveer 2003). Emakala on ainus poegiv kalaliik Eesti vetes. Tema maimudel puudub planktiline periood, sest koheselt peale sündimist asuvad nad elama merepõhjale (Mikelsaar 1984). Sisemine viljastamine toimub augustis-septembris (Larsson jt. 2002) ning kuni 400 täielikult väljaarenenud maimu sünnivad aasta esimese kahe kuu jooksul. Kuna liigi elutegevus toimub veesamba madalamates kihtides, puutub emakala pidevalt kokku põhjasetetesse kuhjunud saasteainetega, mis kuhjuvad ka kaladesse. Emakala teeb heaks uurimisobjektiks tema laialdane levik, vähene migratsioon, suur arvukus, põhjalähedane eluviis ning kõrge eluiga. Seetõttu on emakala üks liik, kelle biomarkereid kasutatakse mere reostuste seires Rootsis, Taanis, Saksamaal (Rudel jt. 2010, Hedman jt. 2011)

Räimel (*Clupea harengus membras*) on Eesti rannikuvetes kolm peamist asurkonda- Liivi lahe räim, Soome lahe räim ja Läänemere kirdeosa avamereräim (Raid, 2006). Räim koeb mere põhjale; taimedele ja muule substraadile. Kudemiseks eelistab ta pidevalt liikuva veemassiga alasid, kus oleks piisavalt suur hapniku juurdevool. Räim on planktonitoiduline kala, kes Eesti kliimaoludes talvel paastub ning alustab söömist alles mai keskel. Samuti peatab koelmutel olles räim toitumise, sest kogu kõhuõõs on täis marja või niiska. Peale kudemist langeb räime kehamass oluliselt, vanematel isenditel kuni 40% (Rannak 1988). Räim on Eestis olulisemaid tööduslikult püütavaid kalasid ning seetõttu ka peamisi ohte, kuidas merre lastud keskkonnamürgid jõuavad ringiga tagasi inimese toidulauale. Eesti rannikumerest püütuid suuri räimi (üle 22cm) ei soovitata süüa üle paari korra kuus (Roots 2011).

Ahven (*Perca fluviatilis*) on Eestis laia levikuga kala, keda püütakse ka tööduslikult. Ahven toitub teistest kaladest, seal hulgas liigikaaslastest ja selgrootutest. Esimesel ja osalt teiselgi eluaastal on ahvena peamiseks toiduks zooplankton. Röövtoidule üleminek toimub harilikult teisel-kolmandal eluaastal. Toitu võib püüda nii üksikult saaki varitsedes kui

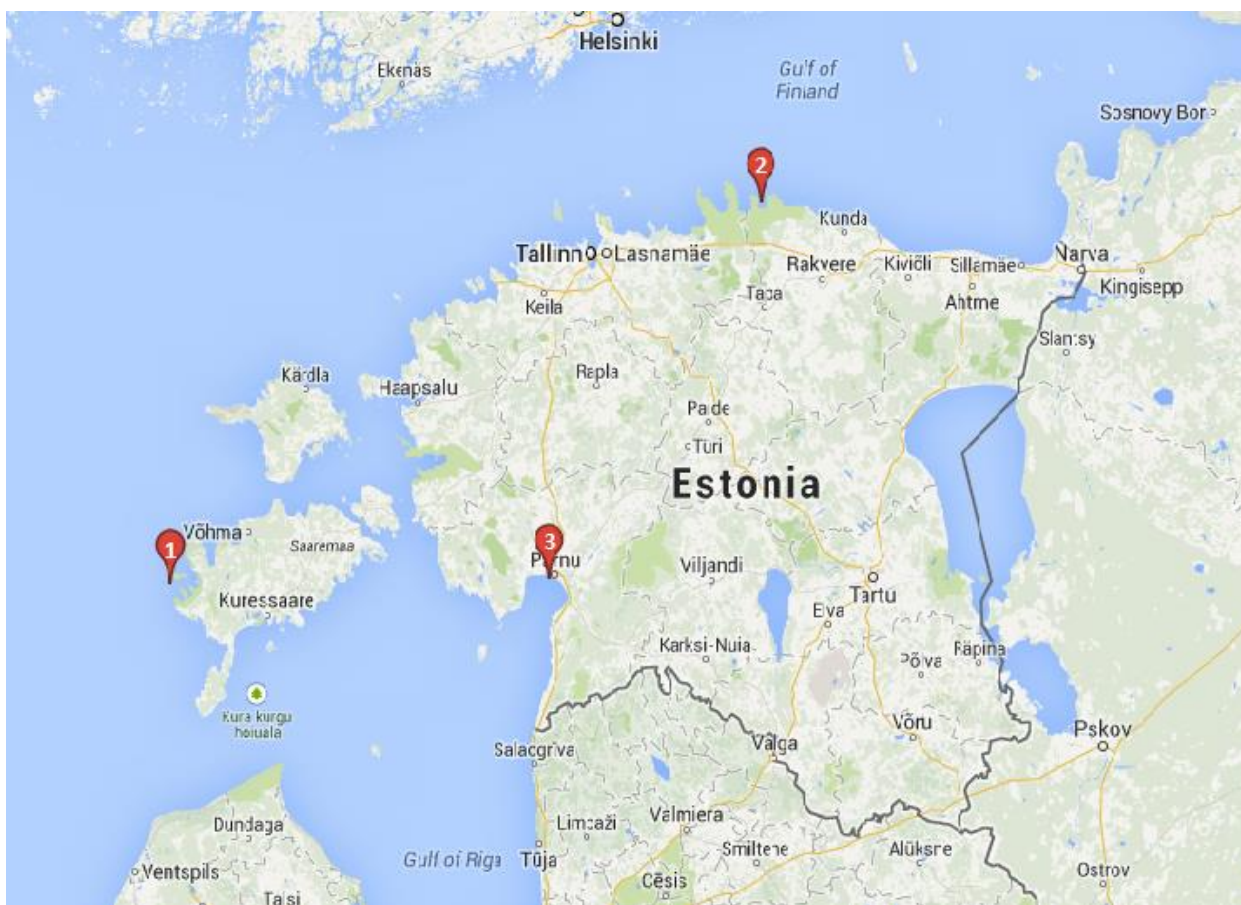
kollektiivselt parves jahti pidades. Suguküpsuse saavutavad emased isendid 3-5 aastasel, isased aasta nooremalt. Kudemine algab pärast jääminekut, tavaliselt aprilli lõpul, kui vee temperatuur on 6-8 °C ning kestab 3-4 nädalat (Raid 2006). Marjaterad väljutatakse pika võrkja seintega toruja marjalindina, mis kinnitub kõiksuguste vees olevate esemete (kivide, okste, rampade, kuhjalavade, isegi seisevpüüniste, tugevamate veetaimede jne.) külge, jäädes vette hõljuma. Sel kombel saab ahven sugu jätkata ka niisugustes mudase põhjaga soojärvedes, kus teistel kaladel puuduvad kudemistingimused. (<http://www.kalapeedia.ee/>).

Särg (*Rutilus rutilus*) on taimestikulembene parvekala, kes toitub põhjaselgrootutest, taimeosistest ja loomsest hõljumist. Suguküpuse saavutab 3–5-aastaselt, olles 8–3 cm pikkune. Koeb aprillis-mais kevadise suurvee ajal taimedele 5000–200 000 näsalise pealispinnaga kleepuvat marjatera. Riimveelised isendid rändavad kudema magevette. Ristub mitme teise karpkalalasega. (Raid 2006). Särg on rangelt päevase eluviisiga. Eesti üks tavalisimaid kalu; läänerranniku vetes ka levinud töõnduskala (<http://entsyklopeedia.ee>).

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1. Uurimisalade kirjeldus

Proove koguti kolmelt rannikumere alalt: 1) Vilsandi saare ümbruse rannikumeri, 2) Käsnu laht ja 3) Pärnu laht (Joonis 5).



Joonis 5. Uurimisala kaart kolme märgitud püügikohaga.

Käesolevas uurimistöös analüüsitud kalad koguti koostöös Eesti Mereinstituudiga igaaastase rannikumere kalastiku seire käigus.

Vilsandil püüti kalu ajavahemikus 28.06 – 03.07 2012. Vilsandi uurimisalal koguti kalu Kuusnõmme, Kiirassaare ja Kihelkonna lahtedes ja avameres, Vilsandi saarest lääne ja

põhjapool. Kala püüdmiseks kasutati nakkevõrkusid. (Kalad püüdis Alvar Räägel koostöös Eesti Mereinstituudi töötajatega). Püügipiirkonnad asuvad Vilsandi rahvuspargi alal. Vee temperatuur oli keskmiselt 15°C, pH 8-9 ja soolsus 6,7 psu. Vilsandil on ebatõenäoline oletada lokaalse reostuse olemasolu. Tegemist on rahvuspargiga, mille lähedal puuduvad suuremad linnad, maanteed ning jõed, mis välistab munitsipaalsete ja industriaalsete heitvete poolt kantava saaste. Peamiseks reostusallikaks võiks lugeda vaid tihedat laevaliiklust Läänemere avaosas.

Käsmus koguti proovid ajavahemikul 4.08-11.08.2012. Kala püüdmiseks kasutati nakkevõrkusid. (Kalad püüdis Alvar Räägel koostöös Eesti Mereinstituudi töötajatega).

Käsmu rannikumeri on oligohaliinne. Soolsus oli proovide kogumise ajal 6,6 psu, veetemperatuur oli 18C ja pH 8,77. Olles avatud tormidele on piirkond hüdrooloogiliselt aktiivne; tugevad tormid võivad muuta merepõhja struktuuri, paigutades ümber suure hulga setteid. Põhja iseloom võib varieeruda pae või savi pangast kuni pehmete liivadeni. Käsmu piirkonnas omavad inimtegevus ja magevee sissevool vähest mõju. Püügipiirkond paikneb Lahemaa rahvuspargi alal. Ligi 17 000 elanikuga Rakvere linn asub 40 km kaugusel ning suurem maantee (Tallinn- Narva maantee) 17 km kaugusel. Seega võib Käsmu lahe reostust pigem mõjutada Soome lahes toimuv intensiivne laevaliiklus ja reostuse kaugkanne läbi õhu.

Pärnus püüti kalad ajavahemikus 02.10 – 03.10.2012. Pärnu lahes püüti kalu nakkevõrkudega Vana-Pärnu ja Valgeranna alt. Traaliga püüti keset Pärnu lahte laevatee kõrvalt. (Kalad püüdis Alvar Räägel koostöös Eesti Mereinstituudi töötajatega). Vee temperatuur oli keskmiselt 12°C ja soolsus 4 psu. Pärnu laht on üsna madal ning poolsuletud rannikulaht. Põhjas esineb valdavalt peenliiv, vaid paiguti on kivised alad. Laht on tugevalt mõjutatud Pärnu jõest. Vee soolsus sõltub aastaajalisest veehulga varieerumisest, olles kevadel alla 1 psu ning sügisel kuni 5 psu. Pärnu jõe valgala territooriumil asub 56 väetisehoidlat (sh. endised), 145 kütusehoidlat, 78 prügilat, 5 vana asfaltbetoonitehast. Lisaks veel 134 asulat ja linna, kus elab üle 150000 inimese (andmed- Pärnu jõe valgala veekasutuskava projekt 1999).

3.2. Uuritavad liigid

Uurimistöös kasutati viite Läänemeres levinud kalaliiki — lesta alamliiki, emakala, ahvenat, räime ja särge. Emakala ja lest on kergesti püütavad paiksed põhjakalad ning ka standardised seireliigid üle kogu Euroopa (Hedman jt. 2011, Kirby jt. 2007). Räime ja ahvenat seiratakse Eesti rannikumere ohtlike ainete seires (seire.keskkonnainfo.ee). Uuritavate liikide lühikirjeldused on esitletud antud töö teoreetilised osas.

3.3. Kalade analüüs

Kalad surmati ja analüüsiti vahetult pärast püüki. Uurimistöös analüüsiti kokku 216 kala. Vilsandi valimi moodustas 9 särge, 16 ahvenat, 30 emakala, 15 lesta ja 15 räime. Käsmus püüti 16 ahvenat, 20 särge, 12 emakala, 15 lesta ja 15 räime. Pärnus püüti 14 ahvenat, 14 lesta, 6 emakala, 15 särge ja 4 räime. Kõikidel püütud kaladel määrati sugu, kehakaal, keha pikkus ja maksa kaal. Arvutati keha konditsiooni faktor ($CF = \text{kogukaal grammides} / \text{kogu pikkus}^3 \text{ grammides} * 100$), maksa indeks ($LSI = \text{maksa kaal grammides} / \text{kogukaal grammides} * 100$). EROD testi eelselt säilitati maksa proovid külmutatuna -80°C juures. (Kala proovid kogusid Alvar Räägel ja Randel Kreitsberg)

3.4. EROD aktiivsuse mõõtmine

EROD testi analüüsides kasutati tris(hüdrosümetüül)aminometaan hüdrokloriidi (TRIS) pH7,5, etüleendiamiintetraädikhapet (EDTA), etoksüresorufiini, resorufiini, dimetüülsulfoksiidi (DMSO) ja nikotiinamiid adeniin dinukleotiid fosfaati (NADPH), mis on pärit Sigma-Aldrich (USA).

Maksa homogeniseerimisel ja EROD mõõtmisel kasutati Kirby (2000) poolt kirjeldatud meetodit. Pooleldi sulanud, 40— 350 mg kaaluvad maksa tükid homogeniseeriti jääkülma homogeniseerimise puhvriga, suhtes üks viiele. Puhver sisaldas 50 mM TRIS pH7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl. Proovide homogeniseerimine toimus 30 sekundit kiirusel 1200 pööret

minutis. Protseduuriks kasutati tefloniga kaetud klaasnuia, mis oli kinnitatud akutrellile. Saadud homogenaat pandi polüetüleen eppendorfi ning säilitati jääs. Homogenaadid tsentrifuugiti 10000g kiirendusega 20 minutit 4⁰C juures. Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant, mis säilitati -80⁰C juures.

Kasutati Bio Tek Synergy 2 fluorestsents plaadilugejat (Gen 5 arvuti tarkvara), mille proovi sisenev ning seda ergastav kiirgus oli 530 nm. Sealt kiirguvat kiirgust mõõdeti lainepikkusel 590 nm. Lisaks rakendati prooviplaadi raputamise funktsiooni. Proovide temperatuuri kontrolliti ruumi temperatuuriga, mis oli 20⁰C. Reaktsiooni mikstuuri lõpp maht oli 300 µl, sisaldades 295 µl analüüsi puhvrit (100 mM pH 7.5 TRIS, 100 mM NaCl), 3 µl maksa homogenaati ning 1,5 µl ethoxyresorufiini substraati (0.4 mM dimetüülsulfoksiidis (DMSO)). Reaktsiooni esile kutsumiseks lisati lahusele 1,5 µl NADPH (0.25 mM) ning kiirguse lugemid salvestati 0, 5, 10, 15, 20, 25 ja 30 minuti pärast peale lisamist. Resorufiini sisestandard asendati resorufiini fluorestsentsi kalibratsiooni kõveraga.

EROD aktiivsus normaliseeriti valgu sisaldusega ning esitati pM resorufiini/min/mg valgu kohta. Proteiini analüüsid viidi läbi samade maksa homogenaatidega, mida kasutati ka EROD aktiivsuse mõõtmisel. Analüüsil rakendati standardset Bradfordini valgu määramise meetodikat koos veise verevalgust tehtud standardiga. (EROD aktiivsuse analüüsi viis läbi Alvar Räägel).

3.5. PAH-i spetsiifiline fluorestsentsi mõõtmine

PAH metaboliitide mõõtmiseks kalade sapist kasutati fikseeritud lainepikkusega fluorestsentsi analüüsi. Fikseeritud fluorestsentsi analüüsides kasutati Hitachi F-2500 fluorestsentsi spektrofotomeetrit. Katsel kasutati küvette suurusega 1cm laineala piluga 5nm. Arvutitarkvarana oli kasutusel F1 Solution 2.0 programm. Sapi proovid 48% etanooliga suhtes 1:1600 ja mõõdeti fikseeritud lainepikkuse paaridega (kiirgav lainepikkus ja küvetist väljuv lainepikkus vastavalt), et avastada PAH-i metaboliite: 290/380 nm sagedus vastab naftaleenile (2-tuumsed PAH-id); 256/380 vastab 3-tuumalistele PAH-idele; 341/383 nm esindab püreeni (4-tuumalisi PAH-e) ja 380/430 nm esindab bensopüreeni (5-tuumalisi PAH-e) Tulemused on esitatud fluorestsentsi ühikutes (FU-fluorescence units), mis on proportsionaalne tegeliku

PAH metaboliitide kontsentratsiooniga lahjenduses. (Fluorestsents analüüsid viis läbi Alvar Räägel).

3.6. Andmetöötlus

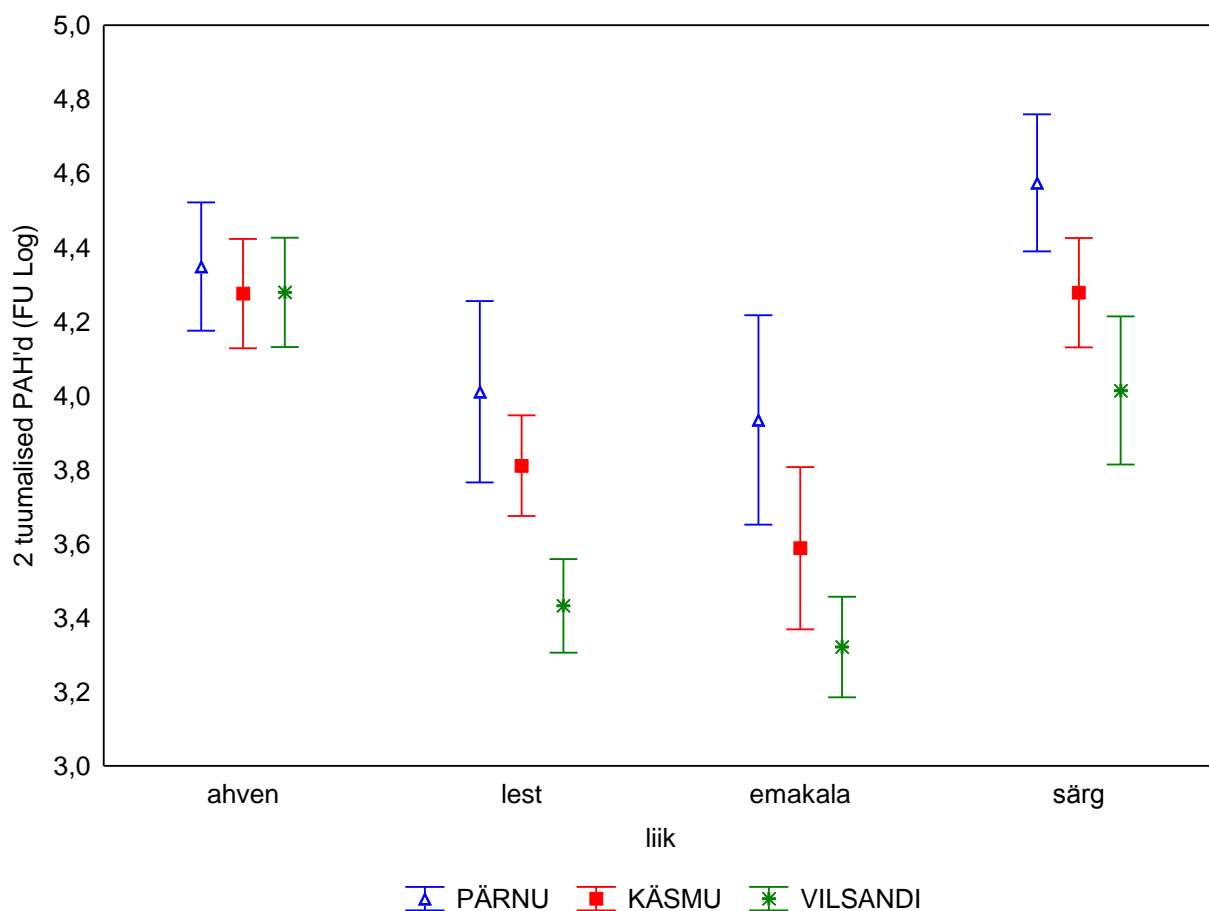
Andmetöötluseks kasutati programmi STATISTICA 7. Biomarkereid mõjutavad näitajaid ning nende olulisust testiti kahefaktoriaalse ANOVA-ga (Andmetöötluse viis läbi Alvar Räägel).

4. TULEMUSED

4.1 PAH metaboliitide fluorestsentsi mõõtmine

PAH-i metaboliitide fluorestsentsi mõõtmiseks saadi sobilikud proovid 107 kalalt. Vilsandil püütud kaladest õnnestus saada sapiproove 11 ahvenal, 13 emakalal, 15 lestal, ja 6 särjel. Kääsmus püütud kaladest saadi kätte esinduslik sapiproov 11 ahvenal, 5 emakalal, 13 lestal ja 11 särjel. Pärnus püütud kaladest olid sobilikud fluorestsentsi proovideks 8 ahvenat, 3 emakala, 4 lesta ja 7 särge.

Kahetuimaliste PAH-i metaboliitidele fluorestsentsi analüüs.

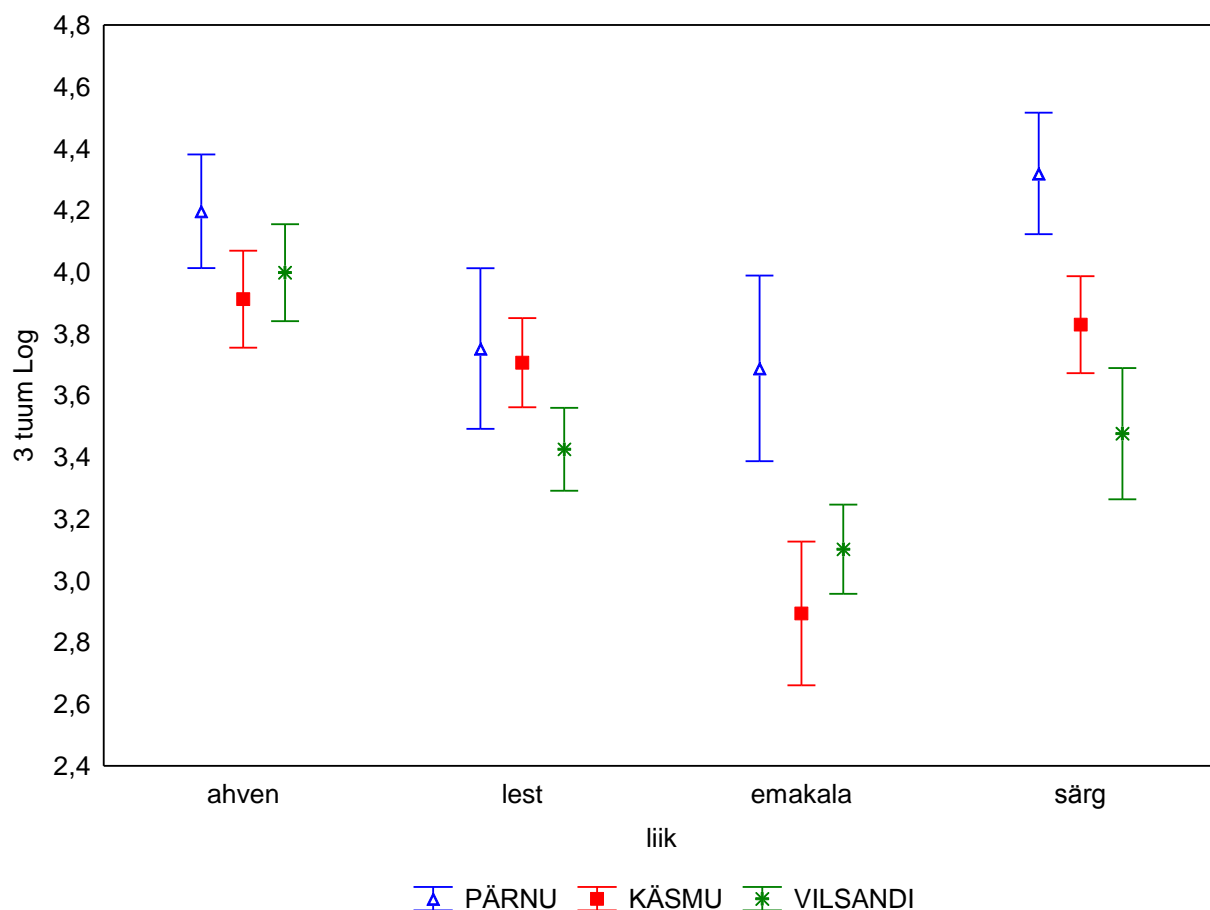


Joonis 6. Kahetuimaliste PAH-ide metaboliitide sisaldus kolmes püügikohas ja neljal kalaliigil mõõdetuna fluorestsentsi meetodil (keskmine \pm standartviga).

ANOVA testis (tüüp III) püügikoha ja liigi mõju PAH-i metaboliitide kontsentratsioonile (Joonis 6). Testis ei tulnud oluliseks liigi ja koha koosmõju ($F_{6,95}=0,671$, $p=0,673$). Peamõjuna on statistiliselt olulised nii liik ($F_{3,95}=11,070$; $p<0,001$) kui koht ($F_{2,95}=5,825$; $p=0,004$). Vilsandi ja Pärnu erinevus tuli oluliseks ($p<0,001$). Samuti on oluline Vilsandi erinevus Käsmust $p<0,001$. Käsmu ja Pärnu erisus oluliseks ei tulnud ($p=0,111$).

Liikidel avastati oluline erinevus ahvena ja lesta vahel ($p<0,001$), ahvena ja emakala vahel ($p<0,001$), lesta ja särje vahel ($p<0,001$), emakala ja särje vahel ($p<0,001$). Olulist erinevust ei leitud ahvena ja särje vahel ($p>0,999$), lesta ja emakala vahel ($p=0,532$). Kofaktoritena ei tulnud oluliseks soo ega pikkuse mõju.

Kolmetuumaliste PAH-i metaboliitide fluorestsents analüüs.

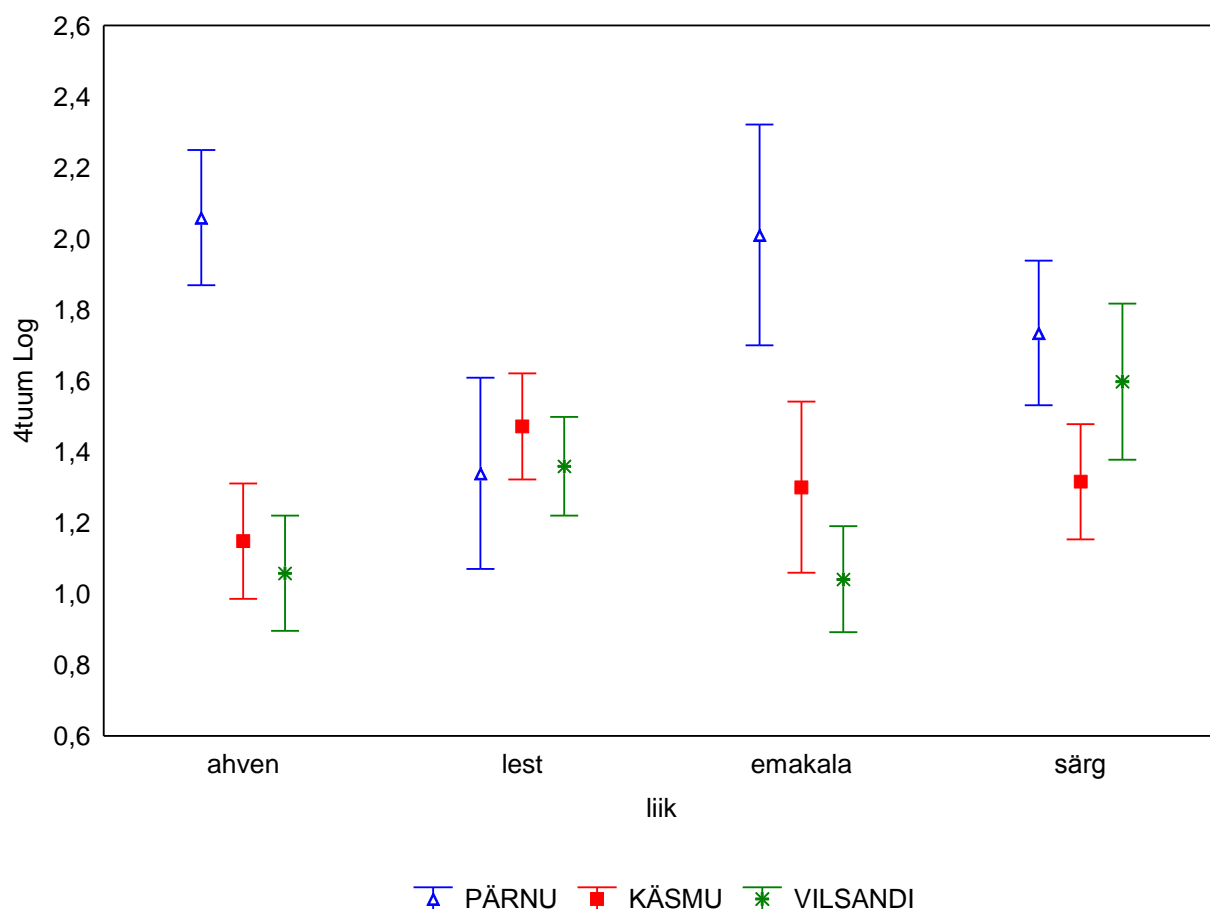


Joonis 7. Kolmetuumsete PAH-i metaboliitide sisaldus kolmes püügikohas ja neljal kalaliigil mõõdetuna fluorestsentsi meetodil (keskmine \pm standartviga).

ANOVA testis (tüüp III) püügikoha ja liigi mõju PAH-i metaboliitide kontsentratsioonile (Joonis 7). Testis ei tulnud oluliseks liigi ja koha koosmõju ($F_{6,95} = 1,040$, $p = 0,404$). Peamõjuna on statistiliselt olulised nii liik ($F_{3,95} = 8,725$; $p < 0,001$) kui koht ($F_{2,95} = 5,825$; $p = 0,004$). Oluliseks tuli Vilsandi erinevus Pärnuga ($p < 0,001$). Samuti tuli Käsma ja Pärnu erinevus oluliseks ($p = 0,016$) Vilsandi erinevus Käsmost ei tulnud erinevaks ($p = 0,141$).

Liike vahel avastati erinevus ahvena ja lesta vahel ($p = 0,007$), ahvena ja emakala vahel ($p < 0,001$), lesta ja emakala vahel ($p = 0,017$), emakala ja särje vahel ($p < 0,001$). Erinevust ei leitud ahvena ja särje vahel ($p = 0,778$) ning lesta ja särje vahel ($p = 0,143$). Kofaktoritena ei tulnud oluliseks soo ega pikkuse mõju.

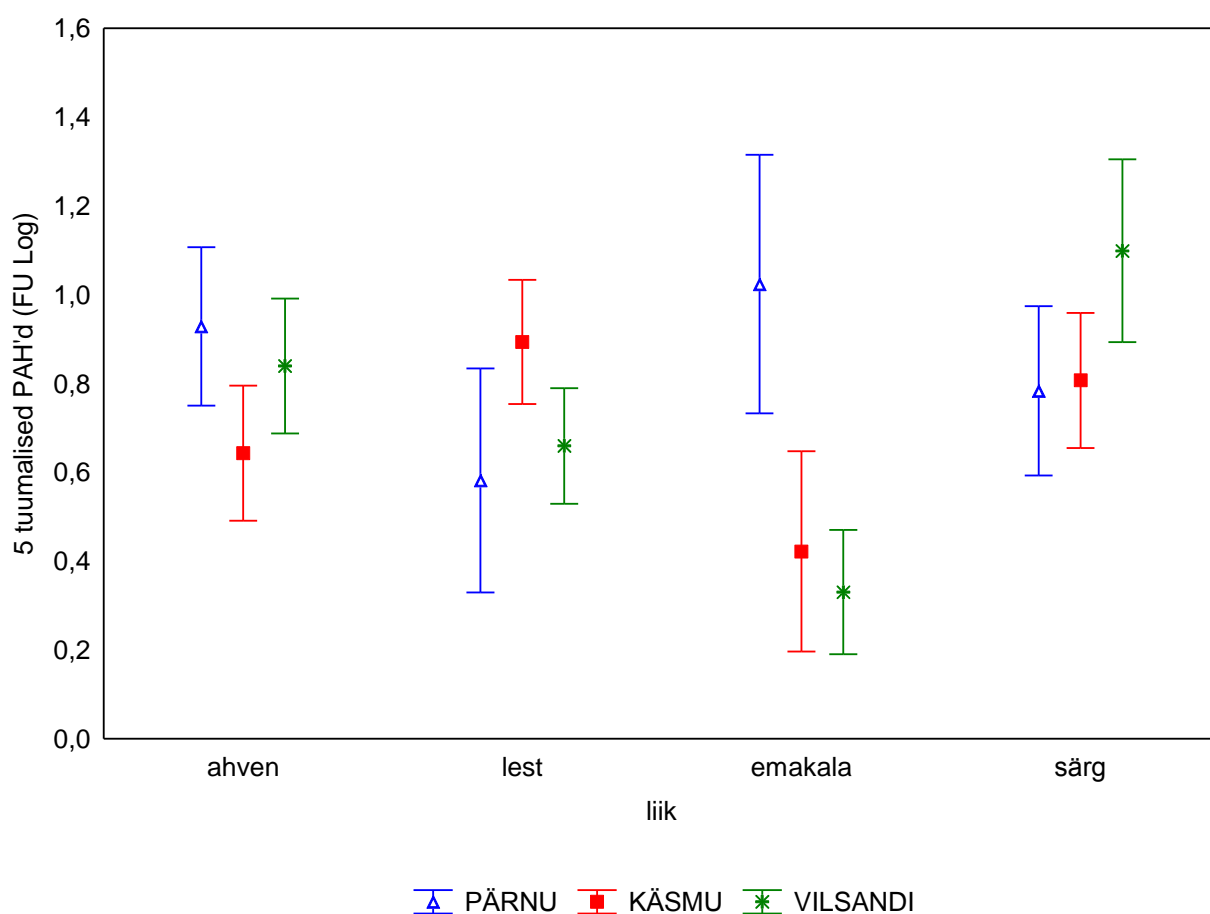
Neljatuumaliste PAH-i metaboliitide fluorestsents analüüs



Joonis 8. Neljatuumaliste PAH-i metaboliitide sisaldus kolmes püügikohas ja neljal kalaliigil mõõdetuna fluorestsentsi meetodil (keskmine \pm standartviga).

ANOVA testis (tüüp III) püügikoha ja liigi mõju PAH metaboliitide kontsentratsioonile (Joonis 8). Testis ei tulnud oluliseks liigi ja koha koosmõju ($F_{6,95}=2,000$, $p=0,073$). Peamõjuna on statistiliselt oluline vaid koht ($F_{2,95}=6,5657$; $p=0,002$). Liigil peamõju puudub. Oluliseks tuli Vilsandi erinevus Pärnuga ($p<0,001$). Samuti tuli Käsme ja Pärnu erinevus oluliseks ($p=0,002$) Vilsandi erinevus Käsme ei tulnud statistiliselt erinevaks ($p=0,707$). Kofaktoritena ei tulnud oluliseks soo ega pikkuse mõju.

Viietuumsete PAH metaboliitide fluorestsents analüüs.



Joonis 9. Viietuumaliste PAH-i metaboliitide sisaldus kolmes püügikohas ja neljal kalaliigil mõõdetuna fluorestsentsi meetodil (keskmine \pm standartviga).

ANOVA testis (tüüp III) püügikoha ja liigi mõju PAH-i metaboliitide kontsentratsioonile (Joonis 9). Testis ei tulnud oluliseks liigi ja koha koosmõju ($F_{6,95}=1,551$, $p=0,169$). Samuti

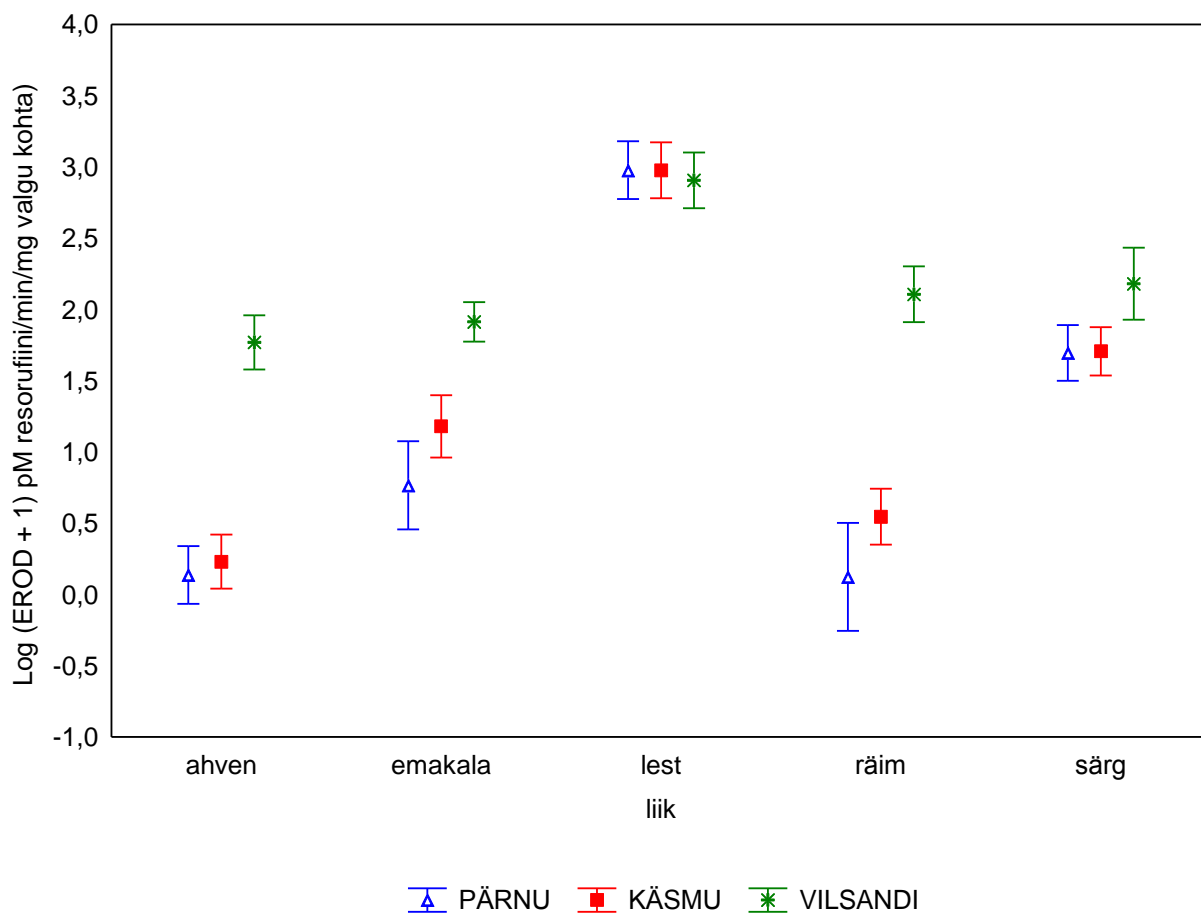
puudus peamõju kohal ning enamus kalaliikidel. Vaid särje ja ahvena erinevus tuli statistiliselt oluliseks ($p=0,031$). Kofaktoritena ei tulnud oluliseks soo ega pikkuse mõju.

4.2. EROD test

EROD testis analüüsiti kokku 216 kala. Vilsandi valimi moodustas 9 särge, 16 ahvenat, 30 emakala, 15 lesta ja 15 räime. Käärmus püüti 16 ahvenat, 20 särge, 12 emakala, 15 lesta ja 15 räime. Pärnus püüti 14 ahvenat, 14 lesta, 6 emakala, 15 särge ja 4 räime.

Tabel 1. EROD-i keskmised väärtused viiel erineval liigil (pmol/min/mg valgu kohta).

Liik	EROD		SE	N
Ahven	2,27	±	0,88	46
Emakala	6,27	±	0,88	46
Lest	19,66	±	0,90	44
Räim	4,03	±	1,02	34
särg	8,51	±	0,91	43



Joonis 10. EROD aktiivsus viiel kalaliigil kolmes erinevas püügikohas (keskmine \pm standart viga)

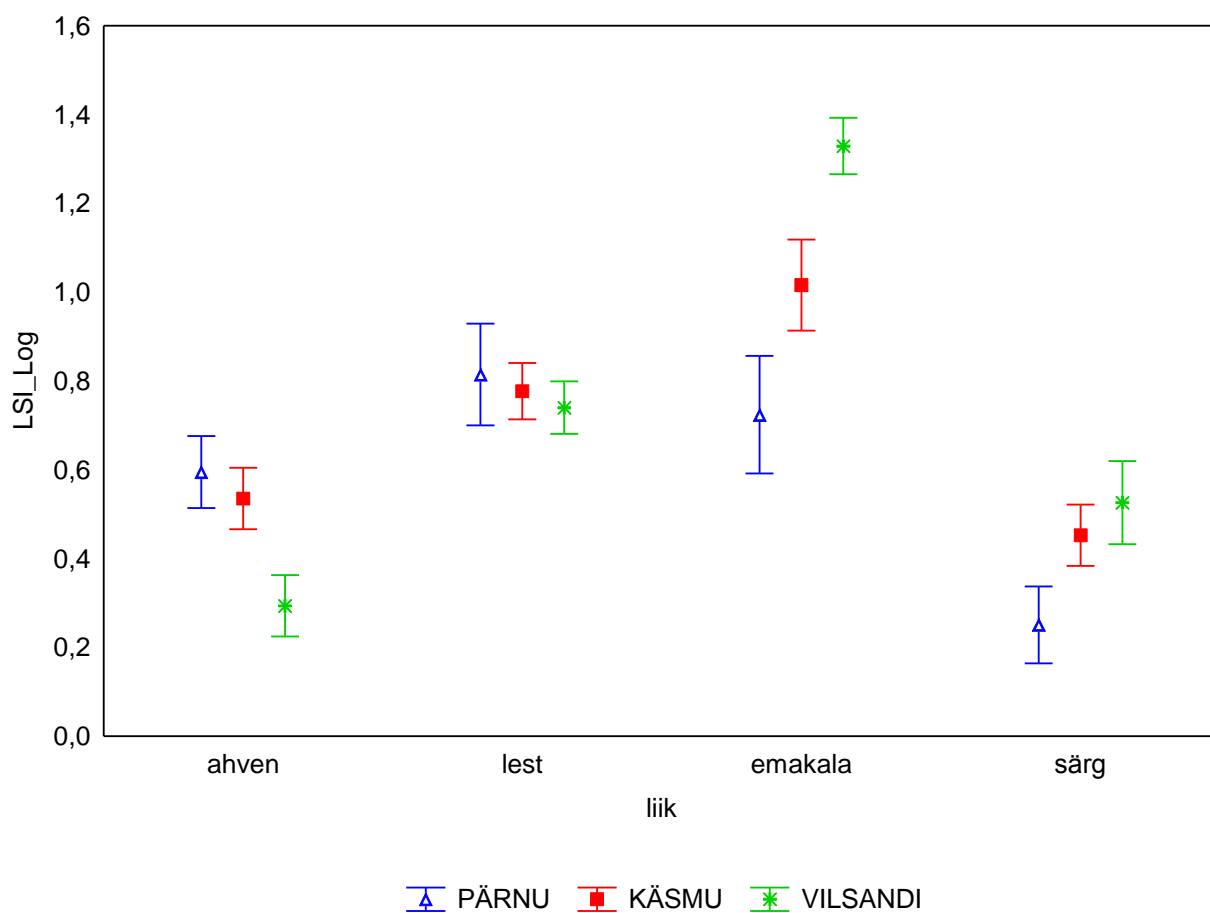
ANOVA (tüüp III) testis püügikoha ja liigi koosmõju EROD aktiivsusele ($F_{8,201} = 4,635$, $p < 0,001$) (Joonis 10). Nii püügikohal kui liigil oli olemas ERODI aktiivsusele peamõju (vastavalt $F_{2,201} = 33,317$, $p < 0,001$ ja $F_{4,201} = 57,843$, $p < 0,001$). Oluliseks tuli erinevus: ahvena ja emakala vahel ($p < 0,001$), ahvena ja lesta vahel ($p < 0,001$), ahvena ja särje vahel ($p < 0,001$), emakala ja lesta vahel ($p < 0,001$), lesta ja räime vahel ($p < 0,001$), lesta ja särje vahel ($p < 0,001$), räime ja särje vahel ($p = 0,042$) (Tabel 1).

Püügikohtade erinevus oli oluline Pärnu ja Vilsandi ($p < 0,001$) ning Käsmu ja Vilsandi ($p < 0,001$) vahel. Kofaktoritena ei tulnud oluliseks soo ega pikkuse mõju. EROD-i aktiivsus ei korreleeru ühegi teise biomarkeriga.

4.3. Maksa indeks

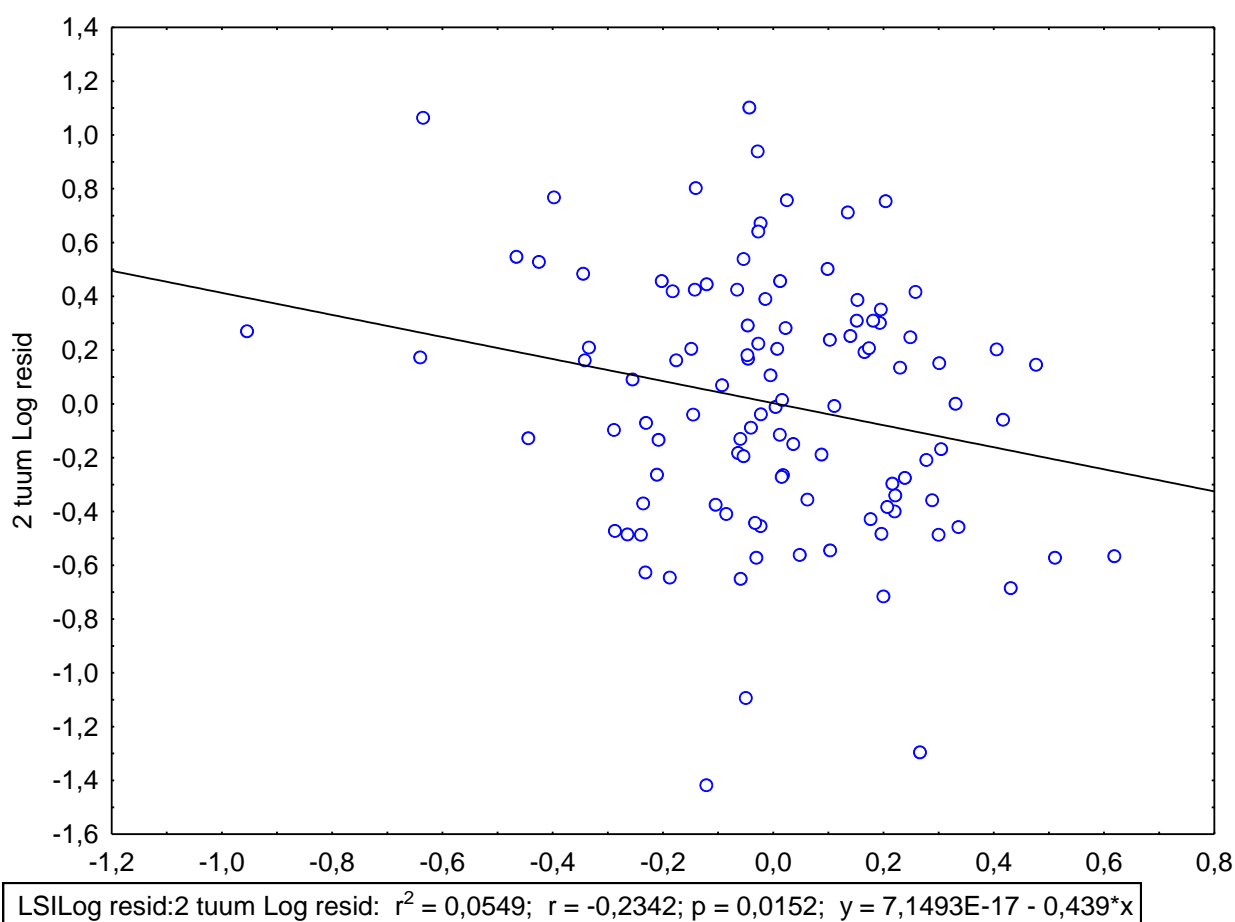
Tabel 2. Nelja kalaliigi maksa indeksid (LSI). Analüüsitud kalade väärtuste keskmine \pm standardhälve. Analüüsist on välja jäetud räimed, sest nende valim polnud selleks analüüsiks esinduslik.

LIIK	LSI		SE
ahven	1,63	\pm	0,1
emakala	3,35	\pm	0,12
lest	2,21	\pm	0,1
särg	1,56	\pm	0,11



Joonis 11. Maksaindeksi varieeruvus neljal kalaliigil ja kolmes erinevas püügikohas.

ANOVA test (tüüp III) mõõtis koha ja liigi koosmõju maksaindeksile ($F_{6,95} = 5,6108$; $p < 0,001$) (Joonis 11). Maksaindeks varieerub oluliselt peaaegu kõikidel kalaliikidel ($p < 0,001$), vaid särje ja ahvena vahel oluline seos puudub ($p = 0,852$) (Tabel 2). Kohtadest erinesid omavahel Pärnu ja Vilsandi ($p < 0,001$); Käsmu ja Vilsandi ($p = 0,044$). Käsmu ja Pärnu vahel olulist erinevust polnud ($p = 0,182$)



Joonis 12. Kahetuimaliste PAH-i metaboliitide ja maksamassi indeksi (LSI) korrelatsioon.

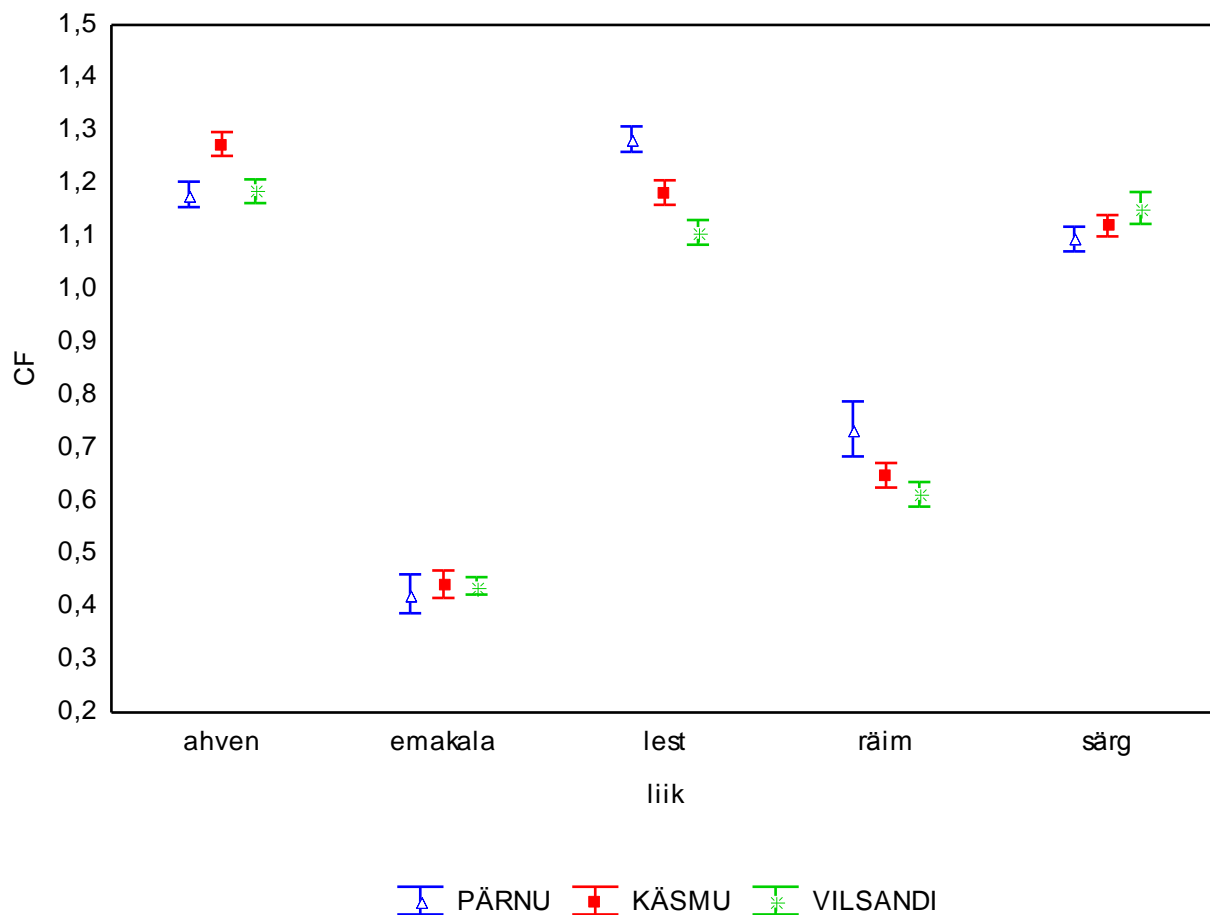
Kaladel kellel on kõrgem kahetuimaliste PAH-i jääkide kontsentratsioon kaldub olema maksa mass suhtes kehamassiga väiksem ($r = -0,235$; $p = 0,015$) (Joonis 12). Kolmetuimaliste PAH-i metaboliitide juures ei tulnud korreleerumine LSI-ga oluliseks ($r = -0,166$; $p = 0,087$). Nii samuti ei täheldatud korrelatsioone neljatuimalistega ($r = -0,062$; $p = 0,523$) ja viietuimaliste

($r = -0,091$; $p = 0,352$) PAH-i metaboliitide juures. Antud analüüsides on arvestatud koha ja liigi peamõjuga.

4.4. Konditsioonifaktor (CF)

Tabel 3. Viie kalaliigi konditsiooni faktorid. Analüüsitud kalade väärtuste keskmine \pm standarthälve.

LIIK	CF		SE
ahven	1,215072	\pm	0,014387
emakala	0,438472	\pm	0,014084
lest	1,189650	\pm	0,014710
räim	0,640243	\pm	0,016986
särg	1,118750	\pm	0,014710



Joonis 13. Konditsiooniindeksi varieerumine viiel liigil erinevates püügikohtades.

Liikide ja koha vahel ilmneb koosmõju: ($F_{8, 200} = 4,77$, $p < 0,0001$) (Joonis 13). Liikide vahel esineb väga oluline erinevus: ahven ja emakala ($p < 0,001$); ahven ja särg ($p < 0,001$); ahven ja räim ($p < 0,001$); emakala ja lest ($p < 0,001$); emakala ja räim ($p < 0,001$); emakala ja särg ($p < 0,001$); lest ja räim ($p < 0,001$); lest ja särg ($p < 0,001$); räim ja särg ($p < 0,001$). Statistiliselt oluline erinevus puudus vaid lesta ja ahvena vahel ($p = 0,667$) (Tabel 3).

Konditsiooniindeks ei korreleerunud ühegi teise biomarkeriga.

5. ARUTELU

PAH metaboliitide kontsentratsiooni määramine fluorestsentsi meetodil. 2- ja 3-tuumsete PAH metaboliitide kontsentratsioonide põhjal on püügikohtade reostuskoormus suuremast väiksemani järgnev. Pärnu>Käsmu>Vilsandi.

PAH jääkidest leidus enim 2- ja 3-tuumseid metaboliite, mis viitavad toornafta ja kütuse sattumisele merre. 4- ja 5-tuumsete PAH-ide metaboliidid viitavad põlemisjääkidele, mis tulevad kas liiklusest, tööstustest või kodustest majapidamistest põletamise käigus. Neid leidus kalade sapis märgatavalt vähem (kontsentratsioonid jäävad 0 kuni 2 FU ühiku vahele), kui 2- ja 3-tuumseid PAH-e. Seetõttu ei ole ka 4- ja 5- tuumsete PAH-ide kontsentratsioonide erinevused erinevatel liikidel ja kohtadel selgelt eristatavad. Üldiselt võib aga arvata, et reostuskoormus on madal kõigis uuritavates püügipiirkondades ning seetõttu pole ka PAHmetaboliitide kontsentratsioonides drastilisi erinevusi. Varasemates ökotoksikoloogia uurimustöodes (Baršienė jt. 2012; Kreitsberg jt. 2012) on Pärnu lahte kirjeldatud kui ühte vähem reostunud piirkonda ning teda on kasutatud referentsalana võrdluses teiste Läänemere osadega. Käesolevas töös, kus on uuringuid teostatud kolmes piirkonnas, millest kaks (Vilsandi ja Käsmu) paiknevad rahvusparki piirides ning eemal linnadest, suurematest autoteedest ja reostusallikatest on arusaadav, et Pärnu võib jääda kehvemasse positsiooni. Pärnu püügikoha puhul on tegemist poolsuletud lahega, mille kaldal paikneb ~40 000 elanikuga Pärnu linn ja kaubasadam, samuti suubub lahte Pärnu jõgi, mille valgjal elab kokku 150 000 elanikku.

2-tuumsete PAH metaboliitide analüüsis on olnud Vilsandi kalade proovid statistiliselt puhtamad kui Käsmu kalad (Joonis 6). Järgmistes analüüsides 3-, 4- ja 5-tuumsete PAH-idega pole kahe koha erinevused enam statistiliselt olulised. Kuna Käsmu lahe ümbruses elab oluliselt rohkem elanikke aastaringelt kui Vilsandi saarel ja Kihelkonna lahe ümbruses Saaremaal, siis on viimati mainitud piirkonna kohati puhtam keskkond ka ootuspärane.

Liikidevahelises võrdluses 2-tuumsete PAH metaboliitide fluorestsentsi testis joonistus välja kaks kalade gruppi. Lest ja emakala kui mere põhjapealsete elupaikade asustajad ning särg ja

ahven, kes elavad kõrgemal veesambas. Üllatav on aga see, et just põhjaelupaiku asustavate grupi sapist leiti vähem 2-tuumsete PAH-ide metaboliite. Üldlevinud teadmise kohaselt on PAH-id rasvlahustuvad toksilised ained, mis veekogudesse sattudes settivad põhjaorgaanikasse. Varasemad uuringud on ka tõestanud, et kõige enam PAH-e leidub veekogudes põhjasetetes, seejärel elustikus ja kõige vähem vees. Seega puutuvad bentilised kalad PAH-idega palju rohkem kokku kui kõrgemal elavad liigid. PAH metaboliitide analüüs sapist seda aga ei kinnita. Siinkohal võiks püstitada hüpoteesi, et põhjalähedastel ja seetõttu PAH-idega teoreetiliselt rohkem kokkupuutuvatel liikidel on välja kujunenud tõhusam jääkainetest vabanemise viis. Kuna PAH-id on ka looduses laialt levinud, pärinedes näiteks vulkaanipursetest, põlengutest ja naftaleketest läbi maakoore pindmise kihi, siis on organismidel evolutsiooniliselt välja kujunenud toimetehhanismid mürkide lagundamiseks. Pole võimatu, et põhjaelupaiku asustavatel liikidel on olnud tugevam valikusurve PAH-idega toimetulekuks, mille tulemusel on kujunenud erineva intensiivsusega kaitsemehhanismid. Sarnasele vastuolulisele tulemusele jõudsid ka Vuorinen jt. (2006) kui nende uurimustöös esines ahvena ja emakala sapis statistiliselt vähem PAH metaboliite kui lestal. Autorid pakkusid ühe võimaliku lahendusena välja, et Läänemere reostus PAH-idega on väikestes kogustes nii pidev, et nende kontsentratsioonid veesambas on tõusnud kõrgele ja merevee dünaamilise liikumise tõttu ei pruugi nad kergesti põhja settida.

3-tuumsete PAH-ide analüüsi juures on näha sarnaseid tendentse, mis 2-tuumsete juures, kuid veidi nõrgema olulisusega (Joonis 7). Võrreldes 2- ja 3- tuumsete PAH- metaboliitide tulemuste sõltuvust konkreetsest liigist ja püügikohast, selgub et liigi mõju on oluliselt suurem kui püügikoha mõju.

4-tuumsete PAH metaboliitide analüüsis pole liikide vahel enam olulist erinevust, kogu erinevus põhineb kohtade poolt põhjustatud varieeruvusel (Joonis 8).

5-tuumsete PAH-ide analüüsis tuleb oluliseks vaid särje ja ahvena erisus, aga puudub püügikohast tingitud mõju (Joonis 9). 4-ja 5-tuumsete PAH metaboliitide varieeruvus tundub olevat ilma selge seaduspärata, mis võib olla tingitud antud PAH-ide madalast kontsentratsioonist, andes seeläbi rohkem kandepinda juhuslikkusele.

Antud töös ei leitud soolisel kuuluvusel kofaktorina mõju PAH metaboliitide kontsentratsioonile. Samas on teada, et metaboliitide kontsentratsioon on sõltuvuses CYP1A ensüümi hulgast, mis transformeerib PAH-e veeslahustuvateks metaboliitideks. Nimetatud ensüümi aktiivsus on aga tundlik suguhormoonidele ja on pärsitud östrogeeni poolt. Vuorinen jt. (2006) märgivad oma Läänemere uuringutes, et isastel emakalade, lestade ja ahvenate sapis on või kaldub olema oluliselt kõrgemas kontsentratsioonis PAH metaboliite.

EROD testi tulemused. Mitmed uuringud viitavad kõrgeenenud EROD testi väärtustele Läänemeres üle aastate (Hansson jt. 2006, Hanson jt. 2009, Hedman jt.- 2011). Hanson jt. (2009) oletab, et tõusnud EROD-i aktiivsus tuleneb PAH-idega reostumisest ja näitab oma töös korrelatsiooni ahvena sapis PAH-ide metaboliitide kontsentratsiooni ja EROD-i aktiivsuse vahel. Samas on ka hulgaliselt töid, kus sellist korrelatsiooni ei leita (Hedman jt. 2011, Kreitsberg jt. 2012).

Antud uurimistöös olid võrreldes varasemate Läänemere toksikoloogia uuringutes leituga EROD testi keskmised väärtused eri liikidel suhteliselt madalad (ahven $2,27 \pm 0,88$; emakala $6,27 \pm 0,88$) (Tabel 1). Kreitsberg jt. (2012) on mõõtnud Eesti rannikumeres emakalade keskmiseks EROD aktiivsuseks (väärtused on antud pmol/min/mg valgu kohta) 19,07. Veelgi kõrgemaid EROD-i aktiivsuse väärtuseid (200 pmol/min/mg valgu kohta) on mõõdetud Rootsi idarannikul (Heidemann jt. 2011). Ahvenatel on Soome rannikul detekteeritud EROD-i keskmiseks aktiivsuseks $2.7 \pm 3,9$ pmol/min/mg valgu kohta

Kuigi EROD test on kasutuses mitmes jõukamas Läänemere äärses riigis keskkonnamonitooringu vahendina (Rootsi, Taani ja Saksamaa), siis viimasel ajal on ühe enam avaldatud vastuväiteid selle sobilikkuse kohta biomarkerina. Kõrgeenenud EROD-i aktiivsus võib olla tingitud ka teistest kemikaalidest, kui vaid PAH-id. Võimalikud EROD-i aktiivsuse tõusu põhjused võivad veel olla vetikateõitsengul tekkivad toksiidid PCB-i, dioksiinid või sessioonsed ensüümi aktiivsuse tõusud (Hansson jt. 2006, Hedman jt. 2011).

EROD testi sobimatust kinnitab ka käesolev töö, sest EROD-i ja teiste uuritud biomarkerite vahel puudub korrelatsioon ning tulemused on üsna vastuolulised.

Nii kohal kui liigil on tugev peamõju EROD-i aktiivsusele. Kolmest püügikoha eristub oluliselt vaid Vilsandi (Joonis 10). Vilsandi ahvenate ja särje EROD-i aktiivsus on ligi kaks korda kõrgem kui samadel kalaliikidel teistes püügikohtades. See erisus on huvipakkuv aga raskesti seletatav. Ka emakalade kõrgem EROD-i aktiivsus juuni lõpus ja juuli alguses Vilsandil on statistiliselt oluline võrreldes langenud EROD-i aktiivsusega oktoobri alguses Pärnus. Mitmed uurimistööd on näidanud, et järglasi kandvate emakalade östrogeeni suur hulk vähendab ensüümikompleksi P450 taset (Navas ja Segner 2000). Bucheli ja Fent (1995) leidsid, et ensüümikompleksi P450 aktiivsus langeb kalades vahetult enne viljastumist või viljastumise ajal (Kopecka ja Pempkowiak 2008). Augustis-septembris viljastuva emakala puhul väheneb P450 ensüümiaktiivsus seega umbes juunist septembrini. Sarnaselt käesoleva töö andmetele, kus EROD aktiivsus langeb juunist oktoobri alguseni, langeb ka Ronisz (1999) tulemustel Kattegatist püütud emakala EROD aktiivsus märtsist augustini. Leidub ka autoreid, kes täheldavad vastupidist ilmingut. Tairova (2011) märgib, et sügiseti on emakalade CYP1A ensüümi aktiivsus märgatavalt kõrgem kui kevadel. Kuigi antud töös ei saa eristada aja ja koha varieeruvust (Vilsandi proovid on kogutud juuni lõpus ja juuli alguses, Käämus käidi augustis ja Pärnu proovid koguti oktoobri alguses) ei ilmne kuidagi, et hiljem kogutud emakalade proovides võrreldes juunis kogutud Vilsandi proovidega näitaksid kõrgemat EROD aktiivsust.

Lähiaastatel avaldatud töödes on leitud, et EROD-i aktiivsus võiks olla käsitletav biomarkerina vaid juhul, kui proovid kogutakse ühevanuselistelt, ühest soost ja liigist kaladelt, kes pole sel perioodil reproduktiivselt aktiivsed ning kalade püüdmine toimub ühel kitsal ajavahemikus (Tairova jt. 2011). Nende eelduste täitmisel on võimalik vältida liigi, soo, temperatuuri, reproduktiivse aktiivsuse ja vanuse mõju EROD-i aktiivsusele, mis kõik arvatakse teda mõjutavad. Tairova jt. 2011 koguni esitab küsimuse, kas EROD-i aktiivsust põhjustava CYP1A ensüümi tootmine võib geneetiliselt erineda ka ühe liigi erinevatel populatsioonidel. Kuigi antud töös ei täheldatud EROD-i sõltuvust kalade soost ja pikkusest (vanusega otseses seoses olev näitaja) on EROD-i tulemuste tõlgendamine ikkagi raske.

Maksaindeksil (LSI) (Tabel 2) esines negatiivne seos 2-tuumsete PAH-ide metaboliitide kontsentratsiooniga (joonis 12). Tulemuste analüüsil arvestati liigi ja kohamõjuga. Kaladel, kellel on kõrgem 2-tuumsete PAH-i jääkide kontsentratsioon kaldub olema maksa mass suhtes kehamassiga väiksem. Seos ei olnud küll väga tugev ning ei tulnud statistiliselt oluliseks 3-, 4- ja 5-tuumsete PAH-i metaboliitide juures. Samas 3-tuumaliste PAH-ide puhul oli seos lähedal statistiliselt olulisele p väärtusele ($r = -0,166$; $p = 0,087$) ning 4- ning 5-tuumsete PAH-ide madalaid väärtusi ja juhuslikku varieeruvust sai kirjeldatud varasemalt. Seega käesoleva töö tulemused toetavad pigem arvamust, mille kohaselt reostuse suur koormus pärsib maksa kasvu ehk maksa massi suhe keha massi väheneb reostuse suurenedes (Barton ja Schreck 1987, Tuvikene 1997, Kreitsberg jt. 2012). Samas ei maksaks saadud tulemust ja maksaindeksit kui biomarkerit ületähtsustada, sest on avaldatud piisaval hulgal teadustöid, kus kogetakse vastupidist trendi (Theodorakis jt. 1992, Everaarts jt. 1993). See erinevus võib olla seletatav, kas maksa toksikoosi erinevate staadiumite, individuaalse geneetilise metaboolse varieeruvuse, mürgiga kokkupuute kestuse, tüübi või organismide erinevate kompensatoorsete mehhanismidega vastuseks toksiinidele. Lühemaajalisel kokkupuutel mürkidega võib kahjustuda osa maksa kudet ning asenduda rasvkoega, hilisemas faasis tekib sidekoestumine ning histoloogilised muutused mis viivad maksa massi vähenemiseni (näiteks krooniliste alkohoolikute maksa rasvumine ja hilisem kärbumine e. tsirroos). Lisaks võib maks, kui energia talletaja, suureneka rikkaliku toitumispiirkonna tõttu. Maksa indeksi suhtes on erinevatel autoritel vastukäivad arvamused ning regulaarses reostuse seireks teda seetõttu hetkel kasutada ei saa.

Konditsioonifaktor (CF) (tabel 3) Varasemalt on täheldatud Läänemere emaste emakalade konditsioonifaktori tugevat positiivset korrelatsiooni maksa indeksiga (Vuorinen jt. 2006). Antud töös konditsiooniindeksi seos ühegi teise biomarkeriga statistiliselt oluliseks ei osutunud.

Kuigi biomarkereid on ka varem Eesti rannikumeres uuritud, lisab minu tööle väärtust monitooringus kasutatud lai liigiline spekter. Kui lihase proovide võtmine on üsna standartne kõikidelt kalaliikidelt ja analüüsiks sobilik maksaproov on samuti kättesaadav enamus

kaladelt, siis suuremat erisust tekitab sapiproovide hankimine. Anatoomiliselt on sapp eraldatav kõige lihtsamini emakaladelt ja lestalt. Särje ja räime puhul eeldab see rohkem kannatlikust ja suuremat valimit. Probleemid sapi eraldamisel olid ka põhjuseks, miks ei saadud PAH-i fluorestsentsi katseks kokku esinduslikku valimit räimedest. Seetõttu on soovitatav tulevikus koguda proove lestalt, emakalalt ja samuti ahvenalt. Viimane on väga levinud kala, kellelt on võimalik proove koguda kergema vaevaga.

Üldiselt leidsid analüüsides vähe korreleerivust erinevate biomarkerite vahel. Veelkord leidsid kinnitust viimasel ajal avaldatud kahtlused EROD testi sobivuse kohta biomarkerina, kuna testis mõõdetav aktiivsete ensüümide hulk on mõjutatud väga paljudest bioloogilistest ja abiootilistest teguritest kala elukeskkonnas. Oma töös ei leidnud ma PAH metaboliitide ja EROD testi omavahelist korreleeruvust. Maksaindeks (LSI) korreleerus kergelt 2 tuumsete PAH metaboliitidega sapis, teiste biomarkerite korrelatsiooni ei täheldatud. Ka keha konditsiooni faktor (CF) ei korreleerunud teiste biomarkeritega. Kuna keha konditsiooni faktor on väga lai biomarker, on tema puhul pigem tegemist kõrvaltulemustega, millel on ilma teiste biomarkerite või keemilise analüüsi tulemusteta vähe väärtust. Uuritavatest biomarkeritest andis nii minu uurimustöö, kui ka loetud kirjanduse põhjal kõige usutavamaid andmeid PAH-i fluorestsents analüüs, mis oli ka oma lihtsuses suhteliselt kiirelt ja odavalt teostatav. Sellest saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et kõige rohkem on katsetes kasutatud püügipiirkondades esindatud laevaliiklusest tulenev reostus ning põlemisjääkidest tulenevad PAH-id veekeskkonnale nii suur mõju ei avalda.

Võrreldes liigilise kuuluvuse ja püügikoha mõju saadud tulemustele, selgub, et kuigi mõlemad on statistiliselt olulised, on liikide erisustest tingitud mõju suurem kui erisused, mida põhjustasid püügipiirkonnad. Sellest järeldub, et erinevate liikide samu biomarkereid omavahel keskkonnamonitooringul võrrelda ei saa.

Soovitatav oleks tulevikus biomarkerite uuringutesse kaasata keemiline test, kas siis uuritavatest organismidest või keskkonnast selleks, et saada biomarkerite kõrvale võrdlusmaterjali. Sellega saaks konkreetselt siduda PAH-ide kontsentratsiooni Eesti rannikumeres PAH metaboliitide kontsentratsiooniga kalade sapis ning vaadata nende

omavahelist korreleeruvust. Tulevikus võiks biomarkerite uuringuid siduda Eesti riikliku ohtlike ainete seirega meres. Biomarkeritel põhinevate meetodite väljatöötamine ökotoksikoloogia vallas on kindlasti tervitatav, nii majanduslikel põhjustel kui ka laiemapõhjalise info hankimiseks. Kui seda suudab pakkuda keemiline analüüs. Oma tööst tulenevalt võin öelda, et PAH metaboliitide kontsentratsiooni määramine fluorestsents testi kaudu määramaks fossiilsetest kütustest tulenevat reostust väärIB kaalumist.

6. KOKKUVÕTE

Käesolev töö analüüsib levinumaid kalade biomarkereid Eesti oludes, et anda infot biomarkerite usaldusväärsuse, neid mõjutavate tegurite kohta ning anda hinnang nende võimaliku sobivuse kohta Eesti rannikumere reostuse seires. Läänemere reostatus on tõsine probleem nii mere ökosüsteemide kaitsmise kui ka otseselt inimese hea tervise seisukohalt. Biomarkerite kasutamine ohtlike ainete seires annab mitmekülgset infot loomade tervise, reostunud paikkade lokaliseerimise ja reostatuse muutuse kohta ajas. Võrreldes keemilise analüüsiga loodetakse biomarkeritelt saada rohkem infot eluslooduse tervisliku seisundi kohta.

Antud töös on analüüsitud nelja biomarkerit: PAH metaboliitide kontsentratsiooni sapis, EROD testi, keha konditsiooni faktorit (CF) ja maksa indeksit (LSI).

Biomarkerid mõõdeti viiel kalaliigil: lest, emakala, särg, ahven ja räim. Koos kaladega on võrdluse alla ka 3 püügikohta (Vilsandi, Käsmu ja Pärnu), kus kohast on uurimustööks kasutatud isendid pärit.

Töö tulemustes leiti biomarkerite vahel vähe korreleeruvust. Kõige usaldusväärsemad andmed andis PAH metaboliitide kontsentratsiooni mõõtmine kalade sapist, mille tulemused lubavad järeldada, et põhiline reostus püügipiirkondades pärineb toornafta ning kütuse sattumisest merre. PAH-ide metaboliitide kontsentratsioon ning EROD testi tulemused omavahel ei korreleerunud, mistõttu toetab töö kahtlusi EROD testi sobivusest biomarkerina.

Analüüsides liigilise kuuluvuse ja püügikoha mõju biomarkeritele, selgus, et liigilisest kuuluvusest tulenev mõju on suur ja erinevate piirkondade reostuskoormuse võrdlemiseks tuleb biomarkereid analüüsida samal kalaliigil.

Kõikidest tulemustest lähtuvalt võib PAH-ide metaboliitide kontsentratsiooni uurimine kalade sapist kujuneda tulevikus sobivaks meetodiks määramaks rutiinsel keskkonnamonitooringul fossiilsetest kütustest tulenevalt reostust Eesti rannikuvetes.

7. SUMMARY

Comparison of different toxicological fish biomarkers in the coastal water of Estonia.

The main aim for this study was to analyse different most wide-spread biomarkers under Estonia's conditions, to give information about their credibility and describe factors that influence their results. Also to assess their possible usefulness in pollution monitoring in the coastal water of Estonia.

Pollution in the Baltic Sea is a serious problem and the use of biomarkers may help to localise the most polluted areas and provide valuable information about the long term effects of the pollution and the general health of the aquatic system.

In this study four biomarkers were analysed: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity, the concentration of PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) metabolites in fish bile, condition factor (CF) and liver mass index (LSI).

Analysis was conducted on 5 species of fish: flounder (*Platichthys flesus*), herring (*Clupea harengus membras*), perch (*Perca fluviatilis* L.), eelpout (*Zoarces viviparus*) and roach (*Rutilus rutilus*). These specimens were caught from 3 different coastal water areas- Vilsandi, Pärnu and Käsnu.

The results show little correlation between different biomarkers, also it confirms the doubts about EROD test being a good biomarker, because it is affected by a wide variety of biotic and abiotic factors.

The most trustworthy results were received from the PAH metabolites concentration analysis performed with fixed wavelength fluorescence (FF). In the future that may turn out to be a reasonable biomarker to become routinely used in environmental pollution monitoring in the coastal water of Estonia.

8. TÄNUAVALDUSED

Soovin avaldada tänu oma juhendajatele Randel Kreitsbergile ja Arvo Tuvikesele, kes olid suureks abiks töö valmimisele ja kalade hingeelu tutvustamisel. Põnevad olid talvised laboritööd Võrtsjärve Limnoloogiakeskuses, mis on ainulaadne teadusküla Eestis oma eraldatud asupaiga poolest.

Meeldejäädavad olid suvised kalapüügireisid ajalooliselt tihedalt merekultuuriga seotud paikadesse ja looduskaunitesse kohtadesse. Välitööd viisid mind Eesti kõige läänepoolsemast asustatud saarelt – Vilsandilt kuni kõige põhjapoolsemasse kodumaa pinnale, kuhu kannatab jalga maha toetada – Vaindloo saarele. Siinkohal soovin hea sõnaga meeles pidada Eesti Mereinstituudi seiretöötajaid, tänu kellele mul üldse õnnestus korjata kokku valimid kalaproovide analüüsimiseks. Kuigi minu toiduhävitamise aplus võis olla kohati kiirem kui kalavõrkude puhastamise vilumus, siis loodan, et mind ka tulevikus võetakse ühte paati.

Erilised tänud minu elukaaslasele Kristiin Albertile, kes oma lühikese puhkuse ajast leidis mahti parandada töös enam mitte nii sagedased lugematud sõnastus- ja kirjavead.

Samuti suured tänud Jaanis Lodjakule, kes tutvustas mulle statistilise maailmavaate nüansse.

Veel soovin tänada Toomas Tammaru, kes leidis vahendid sõidukulude katteks.

9. KASUTATUD KIRJANDUS

- Andersson, T. & L. Forlin (1992) Regulation of The Cytochrome-P450 Enzyme-System in Fish. *Aquatic Toxicology*, 24, 1-19.
- Ariese, F., Beyer, J., Wells, D 2005 Two fish bile reference materials for PAH metabolites. *J Environ Monitor* 7 (9) 869-876
- Barton, B. A. & C. B. Schreck (1987) Metabolic cost of Acute Physical Stress in Juvenile Steelhead. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116, 257-263.
- Baršienė, J., Butrimaviciene, L. Grygiel, W. Lang, T. 2013 Environmental genotoxicity and cytotoxicity in flounder (*Platichthys flesus*), herring (*Clupea harengus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) from chemical munitions dumping zones in the southern Baltic Sea. *Marine Environmental Research* 1-12
- Beyer, J. Jonsson, G. Porte, C., Krahn, M.M, Ariese, F. 2010. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review. *Environ. Toxicol Pharmacol*, 30. 224-244.
- Broeg, K.K. Lehtonen 2006 Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar. Pollut. Bulletin* 53, 508–522
- Bucheli, T. D. & K. Fent (1995) Induction of Cytochrome-P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25, 201-268
- Celander, M., 1993. Induction of cytochrome P450 in teleost fish; with emphasis on the CYP1 gene family. Academic thesis, University of Goteborg, Sweden.
- Everaarts, J. M., L. R. Shugart, M. K. Gustin, W. E. Hawkins & W. W. Walker (1993) Biological markers in fish: DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. *Marine Environmental Research*, 35, 101-107.
- Froese, R. (2006) Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations *J. Appl. Ichthyol.* 22 , 241–253

- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology*. 38, 1723-1731.
- Gercken, J., Förlin, L., Andersson, J., (2006) Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from German and Swedish Baltic coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.*
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, 312- 329
- Hanson, N., S. Persson & A. Larsson (2009) Analyses of perch (*Perca fluviatilis*) bile suggest increasing exposure to PAHs and other pollutants in a reference area on the Swedish Baltic coast. *J. Environ. Monit.*, 11, 389-393.
- Hansson, T., E. Lindesjoo, L. Forlin, L. Balk, A. Bignert & A. Larsson (2006) Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity. *Aquatic Toxicology*, 79, 341-355.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. 2009 Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH-s): a review *J. Hazards Mater.* 169(1-3) 1-15
- Hedman, J. E., H. Rüdell, J. Gercken, S. Bergek, J. Strand, M. Quack, M. Appelberg, L. Förlin, A. Tuvikene & A. Bignert (2011) Eelpout (*Zoarces viviparus*) in marine environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2015-2029.
- HELCOM (2011a) Report on shipping accidents in the Baltic Sea areas during 2010.
- HELCOM (2011b) Report on shipping accidents in the Baltic Sea area for the year 2009.
- HELCOM (2010) Hazardous substances in the Baltic Sea – An integrated thematic assessment of hazardous substances in the Baltic Sea. *Balt. Sea Environ. Proc.* No. 120B.
- Jacobsson, A., E. Neuman, et al. (1993) Viviparous blenny as an indicator of effects of toxic substances, Fiskeriverket. Kustlaboratoriet, Öregrund.
- Kammann, U., 2007. PAH metabolites in bilefluids of dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*): spatial distribution and seasonal changes (7 pp). *Environmental Science and Pollution Research* 14, 102-108.

- Kirby, M. F., A. J. Smith, J. Rooke, P. Neall, A. P. Scott & I. Katsiadaki (2007) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic Toxicology*, 81, 233-244.
- Kopecka, J. & J. Pempkowiak (2008) Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 379-391.
- Kreitsberg, R., A. Tuvikene, J. Baršienė, N. F. Fricke, A. Rybakovas, L. Andreikėnaitė, K. Rumvolt & S. Vilbaste (2012) Biomarkers of environmental contaminants in the coastal waters of Estonia (Baltic Sea) : effects on eelpout (*Zoarces viviparus*). *J. Environ. monit* 14, 2298-2308
- Kreitsberg, R., Baršienė, J., Freiberg, R., Andreikenaite, L., Tammaru, T., Rumvolt K., Tuvikene, A., 2013. Biomarkers of effects of hypoxia and oil-shale contaminated sediments in laboratory-exposed gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 227–235.
- Larsson, D. G. J., I. Mayer, S. J. Hyllner & L. Forlin (2002) Seasonal variations of vitelline envelope proteins, vitellogenin, and sex steroids in male and female eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125, 184-196.
- Lech, J.J., Vodcnik, M.J., 1985. Biotransformation. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526_/557
- Lehtonen, K.K., Schiedek, D., Köhler, A., Lang, T., Vourinen, P.J., Förlin, L., Barsiene, J., Pempkowiak, J., Gercken, J., 2006. The BEEP project in the Baltic Sea: Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 523-537.
- Livingstone, D. R. (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57, 195-211.
- Marmon, S. K., P. Liljelind & I. Undeland (2009) Removal of Lipids, Dioxins, and Polychlorinated Biphenyls during Production of Protein Isolates from Baltic Herring (*Clupea harengus*) Using pH-Shift Processes. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7819-7825.

- Martínez -Álvarez, R., Morales, A., Sanz, A., 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75-88.
- Mikelsaar, N. (1984) Eesti NSV kalad. *Valgus*, Tallinn, 432.
- Navas, J. M. & H. Segner (2000) Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Marine Environmental Research*, 50, 157-162.
- Neff, J.M., 2004. Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water. 1. ed., 2. impr. ed. Elsevier, Oxford
- Newman, M., Unger, M. 2003 Fundamentals of Ecotoxicology. *Lewis Publishers*. Boca Raton 2003.
- Ojaveer, E., E. Pihu & T. Saat (2003) Fishes of Estonia. *Estonian Academy of Publishers*, Tallinn, 416.
- Ojaveer, H. & A. Lankov (1997) Adaptation of eelpout *Zoarces viviparus* (L.) to spatially changing environment on the coastal slope of the Gulf of Riga (Baltic Sea). *ICES Document CM 1997/EE*, 03,
- Rannak, L 1988 Räim. Tallinn, Valgus 1988
- Peakall, D., (1992). Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman & Hall, London.
- Peakall, D. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. Introduction. *Exotoxicology* 3, 157-160
- Pikkarainen, A.-L. (2006) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and bile metabolites as contamination indicators in Baltic Sea perch: Determination by HPLC. *Chemosphere*, 65, 1888-1897.
- Rahman, S., Thomas, P. 2012 Effects of Hypoxia Exposure on Hepatic Cytochrome P450 1A (CYP1A) Expression in Atlantic Croaker: Molecular Mechanisms of CYP1A Down-Regulation PLoS ONE 7
- Raid, T 2006 Euroopa kalad. Eesti Entsüklopeediakirjastus 2006
- Richardson, D. M., I. M. Davies, C. F. Moffat, P. Pollard & R. M. Stagg (2001) Biliary PAH metabolites and EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) from a contaminated estuarine environment. *J. Environ. Monit.*, 3, 610-615.

- Ronisz, D., D. G. J. Larsson & L. Forlin (1999) Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 124, 271-279.
- Roots, O. 2011 Eksperthinnangu koostamine rannakalurite kokkupuutele dioksiinide ja dioksiinilaadsete polüklooritud bifenüülidega. 1 - 36.
- Rudel, H., Flidner, A., Kusters, J., Schroter-Kermani, C., 2010. Twenty years of elemental analysis of marine biota within the German Environmental Specimen Bank a thorough look at the data. *Environmental Science and Pollution Research International* 17, 1025- 1034
- Safe, S. & V. Krishnan (1995) Cellular and Molecular Biology of Aryl Hydrocarbon (AH) Receptor - Mediated Gene Expression. *Springer-Verlag Berlin*, Berlin, 33.
- Schiedek, D., K. Broeg, J. Barsiene, K. K. Lehtonen, J. Gercken, S. Pfeifer, H. Vuontisjarvi, P. J. Vuorinen, V. Dedonyte, A. Koehler, L. Balk & R. Schneider (2006) Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 387-405.
- Spies, R.B., Stegeman, J.J., Rice, D.W., Jr, Woodlin, B., Thomas, P., Hose, J.E., Cross, J.N., Prieto, M., 1990. Sublethal responses of *Platichthys stellatus* to organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction.. *Biomarkers of Environmental Contamination.*, . 87- 122.
- Stegeman J, M.E. Hahn (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, CRC Press , pp. 87–206
- Tairova, Z. M., J. Strand, J. Chevalier & O. Andersen (2012) PAH biomarkers in common eelpout (*Zoarces viviparus*) from Danish waters. *Marine Environmental Research*, 75, 45-53.
- Theodorakis, C. W., S. J. D'Surney, J. W. Bickham, T. B. Lyne, B. P. Bradley, W. E. Hawkins, W. L. Farkas, J. F. McCarthy & L. R. Shugart (1992) Sequential expression of biomarkers in Bluegill Sunfish exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology*, 1, 45-73.

- Toutoudaki, M. (toim.) (2010) Xenobiotic metabolism. *Basic Toxicology Course. Eurotox.*
- Tuvikene, A. (1997) Assessment of inland water pollution using biomarker responses in fish *in vivo* and *in vitro*. Tartu, 55.
- Tuvikene, A. (1995) Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici*, 32, 295-309.
- van der Oost, R., J. Beyer & N. P. E. Vermeulen (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13, 57-149.
- Varanasi, U. (1989) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. *CRC Press, Inc.*, 341.
- Vermeulen, N.P.E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.29_/53.
- Vethaak, A.D, Wester, P.W. Diseases of aquatic organisms. 1996, 26 p 99-116.
- Viarengo, A., E. Bettella, R. Fabbri, B. Burlando & M. Lafaurie (1997) Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Marine Environmental Research*, 44, 1-11.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D., 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 53, 479-487
- Whyte, J. J. & D. E. Tillitt (2000) EROD Activity. *Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems*.
- Witt, G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea *Marine Pollution Bulletin* 1995, 31, p 4-12
- Wolz, J., D. Borck, G. Witt & H. Hollert (2009) Ecotoxicological characterization of sediment cores from the western Baltic Sea (Mecklenburg Bight) using GC-MS and *in vitro* biotests. *Journal of Soils and Sediments*, 9, 400-410

Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology Applied Pharmacology* 206, 73-93

LISA 1. Analüüsitud kalade andmestik. Kus 1-isane, 0-emane, kus CF –keha konditsiooni faktor, LSI-maksaindeks, EROD-ensüümi aktiivsus.

Jrk. nr	koht	liik	TL	TW	sugu	CF	LSI	EROD	2tuum	3tuum	4tuum	5tuum
1	Vilsandi	särg	228	154,2	1	1,301008	1,880674		28,6	22,1	3,64	1,981
2	Pärnu laht	ahven	250	185,2	0	1,18528	1,603672	0	64,33	51,52	7,33	2,2
3	Pärnu laht	ahven	197	93,6	1	1,22427	1,07906	1,091333	113,23	84,63	8,19	2,763
4	Pärnu laht	ahven	211	116	0	1,23484	2,034483	0	56,44	47,7	3,74	1,192
5	Pärnu laht	ahven	215	122,4	0	1,23159	1,879085	0	61,6	50,34	4,33	1,625
6	Käsmu	ahven	176	69,4	0	1,27298	1,700288	0	43,37	26,84	3,1	2,576
7	Pärnu laht	ahven	212	108,2	0	1,135585	2,097967	0	91,93	75,07	5,21	1,827
8	Vilsandi	ahven	169	61,9	0	1,282421	1,211632	10,51163	54,7	43,5	2,31	1,782
9	Vilsandi	ahven	173	66,5	0	1,28435	1,473684	5,531174	64,6	52,1	3,61	2,359
10	Käsmu	ahven	174	66,9	1	1,269926	1,255605	0	83,22	65,11	6,77	3,292
11	Vilsandi	ahven	180	68,4	0	1,17284	1,21345	1,58618	37,6	30,1	2,54	1,983
12	Vilsandi	ahven	169	62,9	0	1,303138	1,63752	5,369048	95,1	70,3	1,89	1,219
13	Vilsandi	ahven	161	50,7	1	1,214871	1,282051	8,194541	32,2	23,7	3,36	1,953
14	Pärnu laht	ahven	232	138,3	0	1,107537	1,778742	0	111,43	116,03	27,89	7,369
15	Vilsandi	ahven	160	47	0	1,147461	1,531915	12,23686	103,3	75,6	6,44	4,514
16	Vilsandi	ahven	184	74,9	0	1,202343	1,628838	4,830515	74	55	2,48	1,805
17	Käsmu	ahven	183	75,7	1	1,235215	1,571995	0	42,89	33,67	2,85	1,652
18	Vilsandi	ahven	172	58	0	1,139837	1,086207	4,45157	129,9	92,6	1,34	1,388
19	Käsmu	ahven	172	55,9	0	1,098567	2,021467	0	54,07	34,5	3,69	1,693
20	Käsmu	ahven	153	50,2	1	1,401617	2,430279	0	93,03	69,91	2,79	1,273
21	Käsmu	ahven	157	45,9	1	1,186079	1,459695	1,343252	52,24	32,93	5,35	3,458
22	Vilsandi	ahven	163	47,2	0	1,089881	1,355932	8,630386	70,9	55,1	4,99	2,782
23	Pärnu laht	ahven	231	144,8	0	1,174715	2,037293	2,269756	106,93	101,43	18,23	5,766
24	Vilsandi	ahven	166	51,1	0	1,117112	1,056751	2,269756	102,2	74,5	1,85	1,54

25	Vilsandi	ahven	202	88,6	1	1,074929	1,433409	5,001552	94,1	70	4,27	10,649
26	Käsmu	ahven	167	55,9	0	1,200224	2,039356	0	86,99	61,33	3,26	1,955
27	Käsmu	ahven	174	67,7	0	1,285112	1,639586	1,927937	67,77	47,13	2,12	1,9
28	Käsmu	ahven	182	83,5	1	1,385072	1,928144	0,070818	93,49	62,46	1,49	1,432
29	Käsmu	ahven	167	57,2	0	1,228136	1,660839	0,430653	162,13	111,03	2,88	1,617
30	Käsmu	ahven	174	74,2	0	1,408498	1,401617	0	73,07	52,06	3,14	1,316
31	Pärnu laht	ahven	232	145,7	0	1,166798	2,319835	0	46,31	41,23	5,54	1,844
32	Vilsandi	emakala	279	91,1	0	0,419475	3,172338	3,656055	56,2	40,1	3,06	1,516
33	Käsmu	emakala	253	68,5	0	0,422989	3,591241	5,012241	59,8	35,01	4,65	2,952
34	Pärnu laht	emakala	214	47	0	0,479575	1,595745	0,301563	51,98	34,5	7,53	1,978
35	Käsmu	emakala	183	26,1	1	0,42588	1,724138	0	104,83	73,12	10,08	1,958
36	Vilsandi	emakala	204	36,2	0	0,426401	3,950276	7,645039	17,7	17,5	2,16	1,262
37	Käsmu	emakala	188	31,2	0	0,469549	3,108974	9,667147	42,84	34,29	5,05	2,095
38	Vilsandi	emakala	188	31,5	1	0,474064	3,777778	7,806603	39,1	29,6	4,89	1,798
39	Vilsandi	emakala	182	28,2	1	0,467773	3,156028	8,230587	73,4	57,1	8,77	3,064
40	Käsmu	emakala	233	58,2	0	0,460103	2,697595	16,09593	18,99	6,81	2,04	1,324
41	Pärnu laht	emakala	164	17	1	0,385405	1,941176	0	38,47	30,47	4,17	1,939
42	Vilsandi	emakala	171	22,6	1	0,451981	3,097345	13,29983	34,4	36,2	4,2	2,11
43	Vilsandi	emakala	210	42,2	0	0,455674	4,123223	7,564283	21,8	15,3	1,67	1,208
44	Vilsandi	emakala	230	60,2	0	0,494781	4,23588	4,754586	7,86	6,6	1,06	0,781
45	Vilsandi	emakala	225	53,7	0	0,47144	3,873371		18,7	14,6	1,61	0,665
46	Vilsandi	emakala	204	36,5	0	0,429935	3,260274	0,745514	28,4	23,1	3,36	1,798
47	Pärnu laht	emakala	202	38,8	0	0,470736	2,835052	9,457094	66,84	60,7	13,26	5,63
48	Vilsandi	emakala	225	55,6	0	0,488121	5,413669	5,879383	16,2	17,2	3,13	1,301
49	Vilsandi	emakala	188	32,8	0	0,493629	3,628049		28,5	23,2	4,08	1,694
50	Vilsandi	emakala	189	29,6	0	0,438436	3,716216	0	58,5	36,8	2,42	1,231
51	Käsmu	emakala	183	28,1	0	0,458514	3,096085	0	12,12	3,22	1,38	0,515
52	Vilsandi	emakala	187	28	0	0,428187	4,285714	20,0045	23,3	15,2	2,15	1,079

53	Vilsandi	lest	222	128	0	1,169906	1,71875	19,21223	31,2	33,7	4,11	2,156
54	Vilsandi	lest	292	267,7	0	1,075226	2,936123	20,6239	28,3	33,8	3,38	1,538
55	Vilsandi	lest	250	160	0	1,024	2,6625	19,5194	22,83	25,7	3,28	1,25
56	Vilsandi	lest	309	293,6	0	0,995132	1,917575	20	8,11	7,1	1,29	0,662
57	Vilsandi	lest	283	231,9	0	1,023155	2,031048	25,2393	27,9	31,6	3,45	2,068
58	Vilsandi	lest	250	182	0	1,1648	2,203297	16,05849	25,71	30,5	2,73	1,159
59	Pärnu laht	lest	219	130,9	1	1,246256	2,475172	30,73977	108,53	78,49	3,17	2,101
60	Vilsandi	lest	278	229	0	1,065862	3,283843	18,44814	31,6	33,5	5,16	2,25
61	Käsmu	lest	280	300	0	1,366618	2,083333	15,11894	38,7	39,7	3,82	1,603
62	Vilsandi	lest	285	241,9	0	1,044964	1,703183	13,60174	20,6	24,8	2,53	1,17
63	Käsmu	lest	183	69,1	0	1,127521	2,807525	15,34068	64,09	42,54	5,96	8,629
64	Pärnu laht	lest	215	129,5	0	1,30303	3,250965	14,66433	59,03	45,98	5,09	2,911
65	Vilsandi	lest	232	147,5	0	1,181213	2,630508	25,20194	47,6	41,5	6,26	2,573
66	Pärnu laht	lest	147	42,7	1	1,344237	1,639344	15,22835	44,63	36,51	6,81	1,832
67	Vilsandi	lest	231	141,6	0	1,148755	2,627119	11,64629	45,3	40	5	2,286
68	Vilsandi	lest	250	189,6	0	1,21344	2,489451	13,67145	43,1	41,5	5,24	2,105
69	Vilsandi	lest	242	140,9	0	0,99418	2,214336	10,87121	44,4	33,9	11,17	2,302
70	Käsmu	lest	261	210,1	1	1,181693	2,056164	11,7101	34,8	36,1	3,94	1,604
71	Käsmu	lest	263	217	1	1,192868	2,40553	26,87411	24,52	29,4	3,16	1,571
72	Pärnu laht	lest	221	121,7	1	1,127493	1,972062	25,52363	32,4	25,01	1,93	0,915
73	Vilsandi	lest	211	127,2	0	1,354066	2,106918	14,40165	41,9	37,9	3,68	3,085
74	Käsmu	lest	343	405,9	0	1,005858	1,665435	17,49155	26,01	30	2,81	1,519
75	Käsmu	lest	250	161,9	0	1,03616	2,600371	31,6754	57,6	55,3	4,58	3,554
76	Käsmu	lest	238	140,5		1,042187	1,772242	18,86299	66,7	58,7	4,24	1,895
77	Käsmu	lest	213	110,2	1	1,140362	2,250454	13,86536	36,4	36,4	3,56	1,72
78	Käsmu	lest	238	167,8	1	1,24469	2,205006	21,50124	42,9	50,7	8,12	2,874
79	Käsmu	lest	210	117	0	1,263362	2,367521	50,94719	34,99	16,44	1,99	1,946
80	Käsmu	lest	245	169,4	1	1,151901	2,072019	30,50757	56,6	55,3	8,28	3,527

81	Vilsandi	lest	214	108,6	0	1,108124	1,537753	20,26467	39,4	37,5	3,56	3,419
82	Käsmu	lest	260	222,1	1	1,263655	2,111661	17,24942	80,2	53,2	5,6	3,116
83	Käsmu	lest	260	205,7	0	1,170346	2,139037	13,63231	62,4	54	4,92	2,944
84	Vilsandi	lest	227	123,6	0	1,056674	0,833333	17,68156	43,9	37,5	4,12	3,804
85	Vilsandi	räim	302	262,6		0,953397	1,321401	4,231489	65,2	42,3	3,86	2,6
86	Vilsandi	räim	213	45,1	0	0,4667	0,576497	7,596299	19,1	14,3	1,71	1,118
87	Käsmu	räim	166	28,1		0,614302	1,565836	0	73,63	39,78	1,59	2,099
88	Käsmu	räim	167	27,7		0,594744	1,588448	5,285722	65,31	45,45	2,6	1,704
89	Vilsandi	räim	147	19,3		0,607583	0,673575	10,19443	98,1	73,1	1,53	0,952
90	Pärnu laht	särg	194	81	1	1,109379	0,901235	10,19443	154,13	120,33	6,67	2,512
91	Käsmu	särg	180	64,2	0	1,100823	1,915888	20,63241	54,92	42,9	5,66	3,064
92	Pärnu laht	särg	188	72,3	1	1,08809	1,590595	5,385481	113,13	79,63	5,75	1,999
93	Käsmu	särg	198	83,9	0	1,080852	1,47795	15,14766	222,33	152,03	12,56	6,959
94	Käsmu	särg	190	81,1	0	1,182388	1,454994	2,009104	38,53	18,34	3,07	1,777
95	Pärnu laht	särg	209	86,6	1	0,948591	2,009238	2,921912	56,44	47,7	3,74	1,192
96	Pärnu laht	särg	194	77,6	1	1,062812	1,134021	12,05	61,6	50,34	4,33	1,625
97	Käsmu	särg	173	53,7	0	1,037137	1,340782	0	164,73	111,73	3,91	2,328
98	Pärnu laht	särg	200	76,7	1	0,95875	1,016949	11,82566	144,63	102,43	2,84	1,451
99	Käsmu	särg	150	37,7	0	1,117037	2,864721	11,76588	41,9	47,9	5,85	2,928
100	Käsmu	särg	158	46,2	0	1,171307	1,493506	0	47,42	28,23	3,26	2,093
101	Käsmu	särg	128	22,8	0	1,087189	1,798246	0	108,69	52,69	2,38	1,307
102	Vilsandi	särg	244	158	0	1,087646	1,335443	12,32461	89,5	60,6	13,63	6,339
103	Käsmu	särg	216	116,8	1	1,158995	1,25	5,177335	56,72	33,71	1,16	1,688
104	Pärnu laht	särg	233	133,8	0	1,057763	1,195815	27,0023	135,63	111,43	15,79	5,639
105	Käsmu	särg	183	67,4	1	1,099782	1,454006	12,21408	64,79	34,85	3,11	2,869
106	Vilsandi	särg	262	208,5	0	1,159317	1,505995	12,04869	56,3	24,6	4,05	2,425
107	Vilsandi	särg	242	164,5	0	1,1607	1,531915	5,671124	65,1	47,7	7,41	4,017

108	Käsmu	särg	129	24,7	0	1,150609	1,417004	10,66815	49,01	37,37	3	1,566
109	Pärnu laht	särg	232	142,7	1	1,142773	1,457603	6,373282	67,94	51,44	6,73	3,029
110	Vilsandi	särg	234	156,3	0	1,219864	2,053743	11,24356	40,9	34	4	2,928
111	Vilsandi	särg	256	200,6	0	1,195669	1,974078	10,56065	75	21,4	2,44	2,04
112	Käsmu	särg	119	18,8	0	1,115622	1,329787	18,74226	90,59	47,09	4,6	1,337
113	Pärnu laht	ahven	195	85,9	1	1,158482		0				
114	Vilsandi	ahven	194	101,1	0	1,384669		3,362533				
115	Käsmu	ahven	179	68,3	0	1,190862		0				
116	Pärnu laht	ahven	212	109,8	0	1,152377		0				
117	Käsmu	ahven	170	68,8	1	1,400366		0				
118	Käsmu	ahven	176	62	0	1,137244		2,802452				
119	Pärnu laht	ahven	213	106,2	0	1,09897		0				
120	Käsmu	ahven	179	72,4	1	1,262349		0				
121	Pärnu laht	ahven	190	77,5	1	1,129902		0				
122	Vilsandi	ahven	151	37	0	1,074659		4,454328				
123	Vilsandi	ahven	123	18,5	1	0,99416		0				
124	Vilsandi	ahven	193	88,9	0	1,236602		5,821976				
125	Pärnu laht	ahven	220	123,4	0	1,158903		0				
126	Vilsandi	ahven	215	124,5	0	1,25272		12,23959				
127	Käsmu	ahven	185	91,2	0	1,440389		0				
128	Pärnu laht	ahven	230	165,4	1	1,359415		0				
129	Vilsandi	emakala	181	24,7	0	0,416544		7,254809				
130	Pärnu laht	emakala	263	67,9	1	0,373252		0				
131	Vilsandi	emakala	200	35,3	0	0,44125		7,070954				
132	Käsmu	emakala	318	179,5	0	0,558191		7,083825				
133	Vilsandi	emakala	173	22,6	1	0,436486		11,87447				

134	Vilsandi	emakala	271	98,7	0	0,495917		6,976866				
135	Vilsandi	emakala	190	29,2	1	0,425718		4,850561				
136	Vilsandi	emakala	187	26,7	1	0,408307		4,696428				
137	Vilsandi	emakala	189	27,6	0	0,408812		9,836509				
138	Vilsandi	emakala	291	28,3	0	0,114844		12,69012				
139	Vilsandi	emakala	204	41,5	1	0,48883		10,77131				
140	Vilsandi	emakala	198	36	0	0,463775		6,236684				
141	Vilsandi	emakala	212	37,1	0	0,389373		7,342906				
142	Käsmu	emakala	176	25,8	0	0,47324		0				
143	Vilsandi	emakala	180	27,7	1	0,474966		10,33286				
144	Vilsandi	emakala	174	23,4	0	0,444189		6,63621				
145	Vilsandi	emakala	245	64,3		0,437233		6,667915				
146	Käsmu	emakala	169	20,5	0	0,424711		2,137932				
147	Käsmu	emakala	182	21	0	0,348341		9,308469				
148	Vilsandi	emakala	198	33,8	0	0,435433		8,50581				
149	Käsmu	emakala	185	28,4	0	0,448542		0				
150	Pärnu laht	emakala	176	20,1	1	0,368687		0				
151	Vilsandi	emakala	192	32,1	0	0,453525		6,735088				
152	Käsmu	emakala	188	27,3	1	0,410855		0				
153	Käsmu	emakala	188	27,3	1	0,410855		3,898118				
154	Pärnu laht	emakala	134	11,3	0	0,469639		6,265773				
155	Vilsandi	emakala	168	24,3	1	0,512482		11,2291				
156	Pärnu laht	lest	127	27,9	0	1,36205		43,40044				
157	Pärnu laht	lest	155	45,9	1	1,232587		33,02229				
158	Pärnu laht	lest	193	89,4	1	1,243557		18,64243				
159	Pärnu laht	lest	219	134,6	1	1,281483		14,29694				
160	Käsmu	lest	300	265,2	1	0,982222		9,432235				

161	Pärnu laht	lest	145	42,1	0	1,38095		11,65296				
162	Käsmu	lest	172	80,3	1	1,578084		13,32496				
163	Pärnu laht	lest	169	59,1	0	1,224411		27,31897				
164	Pärnu laht	lest	203	103,2	1	1,233649		14,12232				
165	Pärnu laht	lest	262	261,2	0	1,452343		14,64602				
166	Pärnu laht	lest	192	86,3	0	1,21929		5,557253				
167	Pärnu laht	lest	153	47,5	1	1,326231		22,39055				
168	Käsmu	räim	160	35,4		0,864258		7,543086				
169	Vilsandi	räim	222	72,6		0,663556		4,840875				
170	Käsmu	räim	160	23,8		0,581055		0				
171	Käsmu	räim	163	29		0,66963		2,79693				
172	Vilsandi	räim	227	66,1		0,565098		3,670478				
173	Käsmu	räim	160	25,5		0,622559		0				
174	Vilsandi	räim	183	37,3		0,608633		8,22616				
175	Käsmu	räim	167	29,2		0,626951		0				
176	Vilsandi	räim	175	33,8		0,630671		4,911675				
177	Käsmu	räim	162	28,6		0,672699		0				
178	Vilsandi	räim	195	44,9		0,60554		6,284615				
179	Käsmu	räim	172	29,1		0,571884		0				
180	Vilsandi	räim	214	60,4		0,616305		9,436297				
181	Käsmu	räim	160	26,8		0,654297		0,406199				
182	Vilsandi	räim	232	73		0,5846		14,48851				
183	Käsmu	räim	170	34,5		0,702219		1,33073				
184	Käsmu	räim	203	60,7		0,725606		4,394946				
185	Pärnu laht	räim	174	39,4	0	0,747909		0				
186	Pärnu laht	räim	169	37,1	1	0,768624		0,63699				

187	Vilsandi	räim	150	19,6		0,580741		9,136237				
188	Pärnu laht	räim	158	27,3	1	0,692136		0				
189	Käsmu	räim	163	29		0,66963		0				
190	Vilsandi	räim	192	40,9		0,577856		10,17924				
191	Käsmu	räim	167	28,6		0,614068		0				
192	Pärnu laht	räim						0				
193	Vilsandi	räim	194	44,8		0,613582		6,940126				
194	Käsmu	räim	171	27,3		0,545977		0				
195	Vilsandi	räim	182	33,3		0,55237		5,925282				
196	Vilsandi	räim	188	37,4		0,562857		8,625956				
197	Käsmu	särg	133	28	0	1,190154		11,06052				
198	Pärnu laht	särg	214	112,1	0	1,143837		0				
199	Käsmu	särg	182	69,8	0	1,157821		1,012466				
200	Pärnu laht	särg	200	76,7	1	0,95875		11,82566				
201	Käsmu	särg	150	37,7	0	1,117037		11,76588				
202	Käsmu	särg	128	22,8	0	1,087189		0				
203	Pärnu laht	särg	225	127	0	1,114952		0,622015				
204	Käsmu	särg	216	116,8	1	1,158995		5,177335				
205	Vilsandi	särg	201	68,7	0	0,845996		6,876025				
206	Käsmu	särg	183	67,4	1	1,099782		12,21408				
207	Pärnu laht	särg	221	129,4	0	1,19883		4,055163				
208	Pärnu laht	särg	219	124,8	0	1,18818		4,460851				
209	Vilsandi	särg	271	251,6	0	1,264162		11,10727				
210	Käsmu	särg	135	26	0	1,056749		0				
211	Pärnu laht	särg	209	101,2	0	1,108515		18,67475				
212	Käsmu	särg	119	18,8	0	1,115622		18,74226				

213	Pärnu laht	särg	230	137,7	0	1,13175		0				
214	Käsmu	särg	129	24,1	1	1,122659		4,217901				
215	Pärnu laht	särg	201	98,9	0	1,21789		0				
216	Vilsandi	särg	216	116,1	1	1,152049		20,19816				

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Alvar Räägel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

KALADE TOKSIKOLOOGILISTE BIOMARKERITE VÕRDLUS EESTI RANNIKUMERES,

mille juhendajad on Randel Kreitsberg ja Arvo Tuvikene

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014